

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年10月25日 (25.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/79494 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12,
C07K 16/18, C12P 21/08, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/00,
A61K 39/395, A61P 35/00, 29/00, 7/00

菊地康文 (KIKUCHI, Yasufumi) [JP/JP]. 大友俊彦
(OHTOMO, Toshihiko) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県
御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03288

(22) 国際出願日: 2001年4月17日 (17.04.2001)

(74) 代理人: 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒
102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広
洋ビル Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-115246 2000年4月17日 (17.04.2000) JP
特願2000-321821
2000年10月20日 (20.10.2000) JP
特願2000-321822
2000年10月20日 (20.10.2000) JP
PCT/JP01/01912 2001年3月12日 (12.03.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目
5番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福島
直 (FUKUSHIMA, Naoshi) [JP/JP]. 土屋政幸
(TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]. 大枝匡義 (OHEDA,
Masayoshi) [JP/JP]. 宇野慎介 (UNO, Shinsuke) [JP/JP].

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGONIST ANTIBODIES

(54) 発明の名称: アゴニスト抗体

(57) Abstract: Modified antibodies containing 2 or more H chain V domains and 2 or more L chain V domains of a monoclonal antibody which can transmit a signal into cells by crosslinking a cell surface molecule, thereby serving as an agonist. Because of being usable as agonists for signal transmission, these modified antibodies are useful as, for example, preventives and/or remedies for various diseases such as cancer, inflammation, hormone disorders and blood diseases.

(57) 要約:

本発明は、細胞表面分子を架橋することにより細胞内にシグナル伝達してアゴニストとして作用しうる、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体に関する。この改変抗体は、シグナル伝達のアゴニストとして使用することができ、癌、炎症、ホルモン異常、血液疾患等の種々の疾患の予防及び/又は治療薬等として有用である。

WO 01/79494 A1

明 細 書

アゴニスト抗体

技術分野

- 5 本発明は、細胞表面分子を架橋することによりアゴニスト作用を示す、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体に関する。当該改変抗体は、細胞表面分子を架橋することにより細胞内にシグナルを伝達しうるアゴニスト作用を有しており、種々の医薬として有用である。

10 背景技術

- 特開平9-295999号公報は、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、抗原としてマウス Integrin Associated Protein (マウス I A P) を認識する新規モノクローナル抗体の取得を記載している。また、特開平9-295999号公報は、モノクローナル抗体が骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有することを開示している。

- WO 99/12973は、ヒトの Integrin Associated Protein (以下ヒト I A Pとする ; J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993 にアミノ酸配列及び塩基配列が記載 ; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995) を抗原とするモノクローナル抗体であって、当該ヒト I A P を有する有核血液細胞 (骨髓系細胞及びリンパ球) にアポトーシスを誘起させる特性を有するモノクローナル M A B L - 1 抗体、M A B L - 2 抗体、これを産生するハイブリドーマ、M A B L - 1 (F E R M B P - 6 1 0 0) 及び M A B L - 2 (F E R M B P - 6 1 0 1) を記載している。

- 25 特願平11-63557号は、ヒト I A P を抗原とするモノクローナル抗体から、ヒト I A P を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する一本鎖の F v 領域を有する一本鎖 F v を得たことを開示している。

しかし、I A P を抗原とするモノクローナル抗体の投与は、I A P を有する有

核血液細胞にアポトーシスを誘起するものの、*in vitro* で赤血球の凝集作用をもたらす。これは、IAPを抗原とするモノクローナル抗体を多量に生体内に投与した場合、赤血球の凝集という弊害が生じる可能性があることを示唆するものである。

- 5 本発明者らは、ヒトIAPを抗原とするモノクローナル抗体を用いて、上記の血液疾患の治療薬等として利用するべく鋭意研究した結果、ヒトIAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する一本鎖のFv領域を有する一本鎖Fvを得た。

- 10 一方、改変抗体、特に低分子化抗体、例えば一本鎖Fvは、その低分子化により組織、腫瘍等への移行性を改善し、遺伝子工学的に調製する目的で開発されたものであるが、近年、一本鎖Fvのダイマー、特にヘテロダイマーを細胞同士を架橋させる目的で使用されている。これは、二重特異性 [bispecific] の改変抗体であり、代表的には癌細胞抗原とNK細胞や好中球など宿主細胞抗原を認識する一本鎖Fvのヘテロダイマーが知られている (Kipriyanov et al., Int. J. Cancer, 77, 9763-9772, 1998)。
- 15 これらは、細胞間架橋を誘導させることにより癌を治療するためのより効率的な改変抗体として、一本鎖Fvの構築技術から作成されたものである。このため、抗体およびその断片 (例えばFab断片など) および二重特異性の改変抗体、さらには単一特異性である一本鎖Fvのダイマーでも細胞間の架橋が誘導されと考えられていた。

- 20 また、細胞表面分子を架橋してシグナルを伝達しうるモノクローナル抗体として、例えば細胞の分化・増殖に関与するEPO受容体に対する抗体 (特開2000-95800号公報)、MUSK受容体に対する抗体 (Xie et al., Nature Biotech. 15, 768-771, 1997) などが知られている。しかし、低分子化した改変抗体については報告はない。

- 25 そこで、先ず本発明者は上記MABL-1およびMABL-2抗体並びにこれらに由来する一本鎖FvのダイマーがIAPを有する細胞に対してアポトーシスを誘導することに注目し、これらが細胞表面上のIAP受容体を架橋 (2量体化) することにより当該細胞にシグナルが伝達されて、その結果アポトーシスが

誘導されたことを突き止めた。即ち、これは、単一特異性の一本鎖F_vダイマーが細胞表面上の分子（例えば受容体）を架橋することにより、リガンドと同様にシグナルを伝達し、これによりアゴニスト作用を示し得ること示唆するものである。

- 5 次に細胞間の架橋形成に注目したところ、前記モノクローナル抗体は赤血球凝集を引き起こすが、前記一本鎖F_vのダイマーは赤血球凝集を起こさないことを見出した。同様の結果は、一本鎖2価抗体（2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチド）でも観察された。即ち、これはモノクローナル抗体では細胞間で架橋が形成される可能性があるのに対して、一本鎖F_vダイマー
10 または一本鎖2価抗体等の改変抗体では、細胞表面上の分子を架橋するが、細胞間の架橋を形成しないことを示唆するものである。

- 故に、本発明者は、抗体分子（whole IgG）を一本鎖F_vダイマーまたは一本鎖2価抗体などの改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して、細胞に所望の作用のみを誘
15 起しうる新規な医薬品を提供しうることを見出し、本発明を完成させた。また、本発明の改変抗体は元のモノクローナル抗体と比較して顕著に高い活性を有しており、さらに抗体分子に比べ分子量が小さく、定常領域を有しないという特徴から、組織移行性が向上しているという特徴を有している。

20 発明の開示

本発明の課題は、本発明は、細胞表面分子と結合することにより細胞内にシグナルを伝達してアゴニストとして作用しうる、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む低分子化アゴニスト改変抗体を提供することである。

- 25 従って、本発明は、細胞表面分子を架橋することによりアゴニスト作用を示す、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上、好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含む改変抗体に関する。

本発明の改変抗体は、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含

む一本鎖F_vのダイマーであるか、又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである。該改変抗体中において、H鎖V領域及びL鎖V領域は、好ましくはリンカーを介して連結されている。

5 前記一本鎖F_vのダイマーは、非共有結合によるダイマー、架橋基を介した共有結合によるダイマー、さらに前記一本鎖F_vと結合しうる架橋剤（抗体、抗体断片、又は2価の改変抗体）を介したダイマーが包含される。ダイマーを形成させる架橋基は、ペプチドの架橋に用いられている公知の架橋基を用いることができるが、例えばシステイン残基によるジスルフィド架橋、他の架橋基、例えばC₄～C₁₀アルキレン（例えば、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、
10 ヘプタメチレンおよびオクタメチレンなど）またはC₄～C₁₀アルケニレン（cis/trans-3-ブテニレン、cis/trans-2-ペンテニレン、cis/trans-3-ペンテニレンおよびcis/trans-3-ヘキセニレンなど）である。

また、一本鎖F_vと結合しうる架橋剤は、例えばF_v中に随意に導入しうるアミノ酸配列、例えばFLAG配列等に対する抗体もしくはその断片、またはその
15 抗体由来の改変抗体、例えば一本鎖F_vである。

本発明はまた、細胞表面分子に結合する第1のリガンドと第2のリガンドを投与し、さらに第1及び第2のリガンドに結合して、前記第1及び第2のリガンドを架橋する物質を投与することを特徴とする、細胞にアゴニスト作用を誘導する方法に関する。ここで、第1及び第2のリガンドは架橋されることによりアゴニスト作用を誘導しうるものであればいかなるものでもよいが、好ましくは同一又は異なる一本鎖F_vモノマー、抗体断片等の一価の改変抗体である。また、前記リガンドを架橋する物質は、第1のリガンドと第2のリガンドを架橋して細胞にアゴニスト作用を誘導する物質であればいかなるものでもよいが、好ましくは抗体、抗体断片、(F_ab)₂又は2価の改変抗体である。ここで、2価の抗体の例として、(F_ab)₂、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vの
25 ダイマーであるか、又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドが挙げられる。本方法は、架橋されてシグナルを細胞に伝達する受容体の探索に有効なだけでなく、薬剤のターゲット分子へのDDSへの応用も期待

でき、副作用の抑制や、所望の時期に所望の時間薬剤の効力を発揮せしめる薬剤投与システムとして有用である。

本発明の改変抗体はまた、モノクローナル抗体（例えば、MAB L-1 抗体、MAB L-2 抗体など）のL鎖V領域及びH鎖V領域を含み、細胞表面分子、例えば蛋白質（受容体またはシグナル伝達に関与する蛋白質）、または前記蛋白質もしくは細胞膜タンパク質の糖鎖を特異的に認識して当該表面分子を架橋し、これにより細胞内にシグナルを伝達しうるものであればいかなるものでもよく、さらには、このV領域のアミノ酸配列の一部を改変した改変抗体も包含される

本発明はまた、前記改変抗体のヒト型化に関するものであり、ヒト型化改変抗体はヒト型化H鎖V領域及び／又はヒト型化L鎖V領域を含む。詳細には、ヒト型化改変抗体は、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のフレームワーク領域（FR）とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含むヒト型化L鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域から構成される。この場合、CDRおよびFRのアミノ酸配列を一部改変（例えば、欠失、置換又は付加）してもよい。

さらに本発明は、ヒトモノクローナル抗体L鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成る、ポリペプチドをも包含する。

本発明はまた、上記マウスCDRに相当する、マウス以外の哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）のモノクローナル抗体由来のCDR、又は当該CDRを含有するH鎖V領域及びL鎖V領域を含んで成る、細胞表面分子と結合することにより細胞内にシグナル伝達してアゴニストとして作用しうる改変抗体に関する。そのようなCDR、H鎖V領域及びL鎖V領域には、例えばトランスジェニックマウス等から作製されたヒトモノクローナル抗体由来のCDR、該CDRを含有するヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域も包含される。

本発明はまた、前記種々の改変抗体をコードするDNA、該DNAを含んで成

る組換えベクターを製造する遺伝子工学的方法に関する。

本発明はまた、該組換えベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主は、例えばヒト細胞、マウス細胞などの動物細胞、又は大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物である。

- 5 本発明はまた、上記の宿主を培養し、培養物から改変抗体を採取することを特徴とする、改変抗体の製造方法に関する。

さらに本発明は、一本鎖F_vを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して該培地中に一本鎖F_vを分泌させ、該培地中で形成された一本鎖F_vのダイマーを含む該培地上清を精製することを特徴とする一本鎖F_vのダイマーの製造方法
10 に関する。

本発明はまた、改変抗体のアゴニストとしての使用に関する。即ち、前記得られた改変抗体を有効成分として含有するシグナル伝達アゴニストに関する。本発明において改変抗体は、細胞表面上の受容体を架橋して、これによりシグナル伝達を誘起しうるものであるため、当該受容体は、リガンドと結合して、オリゴマー化、例えば2量体化が促進され、その結果シグナルを細胞内に伝達しうる受容体であればいかなるものもよい。そのような当該受容体には、例えばホルモン受容体やサイトカイン受容体が包含される。ホルモン受容体には、例えばエストロゲン受容体等が包含される。サイトカイン受容体等には、造血因子受容体、リンホカイン受容体、増殖因子受容体および分化抑制因子受容体等が包含される。サイトカイン受容体の例としては、エリスロポエチン（EPO）受容体、トロンボポエチン（TPO）受容体、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）受容体、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体、腫瘍壊死因子（TNF）受容体、インターロイキン-1（IL-1）受容体、インターロイキン-2（IL-2）受容体、インターロイキン-3（IL-3）受容体、インターロイキン-4（IL-4）受容体、インターロイキン-5（IL-5）受容体、インターロイキン-6（IL-6）受容体、インターロイキン-7（IL-7）受容体、インターロイキン-9（IL-9）受容体、インターロイキン-10（IL-10）受容体、
15
20
25

インターロイキン-11 (IL-11) 受容体、インターロイキン-12 (IL-12) 受容体、インターロイキン-13 (IL-13) 受容体、インターロイキン-15 (IL-15) 受容体、インターフェロン- α (IFN- α) 受容体、インターフェロン- β (IFN- β) 受容体、インターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体、成長ホルモン (GH) 受容体、インスリン受容体、血液幹細胞増殖因子 (SCF) 受容体、血管上皮増殖因子 (VEGF) 受容体、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体、神経成長因子 (NGF) 受容体、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 受容体、白血球遊走阻止因子 (LIF) 受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、オンコスタチンM (OSM) 受容体およびNotchファミリー受容体等を挙げることができる。故に、当該アゴニスト改変抗体を有効成分として含有する医薬製剤は、癌、炎症、ホルモン異常および血液疾患などの治療及び／又は予防に有用である。

本発明の改変抗体は、モノクローナル抗体に由来するH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む。当該改変抗体の構成としては、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖Fvのダイマー又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含むポリペプチドとすることができる。該改変抗体中において、H鎖およびL鎖のV領域は、1個以上のアミノ酸からなるペプチドリinkerを介して連結されているのが好ましい。これらの改変抗体は、モノクローナル抗体の可変領域を含有し、且つ相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下CDRとする) を保存し、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する。

H鎖V領域

本発明において、モノクローナル抗体に由来するH鎖V領域には、細胞表面分子、例えば蛋白質 (受容体またはシグナル伝達に関与する蛋白質)、または前記蛋白質もしくは細胞膜上の糖鎖を認識し、且つ前記分子を架橋してオリゴマー化、例えば2量体化することにより、細胞内にシグナルを伝達しうる細胞内にシグナルを伝達してアゴニストとして作用しうるモノクローナル抗体中のH鎖V領域で

あつて、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）に由来するH鎖V領域又は前記H鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したH鎖V領域も本発明におけるH鎖V領域に包含されるが、ヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域が好ましい。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、前記マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域に相当するヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域も用いることができる。また、本発明のH鎖V領域には、前記H鎖V領域の断片であつて、抗原結合性を保持する領域も包含される。

L鎖V領域

本発明におけるL鎖V領域には、細胞表面分子、例えば蛋白質（受容体またはシグナル伝達に関与する蛋白質）、または前記蛋白質もしくは細胞膜上の糖鎖を認識し、且つ前記分子を架橋してオリゴマー化、例えば2量体化することにより、細胞内にシグナルを伝達しうるモノクローナル抗体中のL鎖V領域であつて、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）に由来するL鎖V領域又は前記L鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したL鎖V領域も本発明におけるL鎖V領域に包含されるが、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含むヒト型化L鎖V領域が好ましい。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、前記マウスモノクローナル抗体のL鎖V領域に相当するヒトモノクローナル抗体由来のL鎖V領域も用いることができる。また、本発明のL鎖V領域には、前記L鎖V領域の断片であつて、抗原結合性を保持する領域も包含される。

相補性決定領域（CDR）

L鎖及びH鎖の各V領域は抗原結合部位を形成し、L鎖及びH鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された4個のフレームワークと3個の超可変又は相補佐決定領域（CDR）により連結されている（Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）。

前記4個のフレームワーク領域（FR）の多くの部分は β -シート構造をとり、

その結果 3 個の CDR はループを形成し、CDR は場合により β -シート構造の一部分を形成することもある。3 個の CDR は FR によって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の 3 個の CDR と共に抗原結合部位の形成に寄与する。

- 5 これらの CDR 領域は、得られた抗体の V 領域のアミノ酸配列と既知抗体の V 領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができる。

一本鎖 F_v

- 10 一本鎖 F_v は、モノクローナル抗体に由来する、連結した H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域を含むポリペプチドのモノマーであり、得られる一本鎖 F_v はもとのモノクローナル抗体の可変領域を含有し、相補性決定領域を保存するため、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する（特願平 11-63557 号）。さらに、本発明の一本鎖 F_v において、前記可変領域および／または C
- 15 DR の一部またはそのアミノ酸配列の一部を改変（例えば、欠失、置換又は付加）することができる。本発明の一本鎖 F_v を構成する H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域は上述したものであり、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域を直接又はリンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結することができ、その構成としては、[H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域]、[L 鎖 V 領域] - [H 鎖 V 領域] のいずれでもよい。本
- 20 発明においては、これら一本鎖 F_v はダイマー、トリマー又はテトラマーを形成させ、本発明の改変抗体とすることができる。

一本鎖改変抗体

- 本発明の 2 つ以上の H 鎖 V 領域及び 2 つ以上の L 鎖 V 領域、好ましくは各々 2 ~ 4、特に好ましくは各々 2 つ含む一本鎖改変抗体は、上述のような 2 つ以上の
- 25 H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域をそれぞれ含有する。このポリペプチドにおいて各領域は、該一本鎖改変抗体が特定の立体構造、具体的には一本鎖 F_v のダイマーが構成する立体構造を模倣し得るよう配置させる必要があり、例えば

[H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域] - [H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域]

又は

[L鎖V領域] - [H鎖V領域] - [L鎖V領域] - [H鎖V領域]

の順序で各領域が配置され、これらの領域はリンカーを介して連結される。

リンカー

- 5 本発明において、H鎖V領域とL鎖V領域とを連結するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996 に開示されるリンカーを用いることができる。これらのリンカーは同一分子内で同じ又は異なっているいてもよい。ペプチドリンカーを所望する場合、各々のリンカーの例としては：

- 10 S e r
 G l y · S e r
 G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · S e r
 15 S e r · G l y · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y
 20 G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y
 (G l y · G l y · G l y · G l y · S e r)_n
 (S e r · G l y · G l y · G l y · G l y)_n

- 25 [nは1以上の整数である]を挙げることができる。好ましいリンカーペプチドの長さは抗原となる受容体によって異なるが、一本鎖F_vにおいては通常1～20アミノ酸であるのが好ましい。2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含む一本鎖改変抗体においては、[H鎖V領域] - [L鎖V領域] (又は [L鎖V領域] - [H鎖V領域]) からなる同一の抗原結合部位を形成するもの同士を

連結するためのペプチドリンカーの長さは1～30アミノ酸、好ましくは1～20アミノ酸、さらに好ましくは3～18アミノ酸である。また、[H鎖V領域]－[L鎖V領域]（又は[L鎖V領域]－[H鎖V領域]）からなる同一の抗原結合部位を形成しないもの同士を連結するためのペプチドリンカーの長さは1～40アミノ酸、好ましくは3～30アミノ酸、さらに好ましくは5～20アミノ酸である。これらのリンカーを導入する方法は本発明の改変抗体をコードするDNAの構築方法の説明において述べる。

本発明における合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）

ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス〔2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（BSOCOES）、ビス〔2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

特に、一本鎖F_vのダイマーを形成させる場合、宿主細胞で産生された一本鎖モノマーを培地等の溶液中で、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上ダイマー化するのに適したリンカーを選択することが好ましく、具体的には2～12アミノ酸、より好ましくは3～10アミノ酸、またはこれに相当する他のリンカーが好ましい。

25 改変抗体の製造

改変抗体は、細胞表面分子に特異的に結合する既知または新規なモノクローナル抗体由来のH鎖V領域とL鎖V領域とを前述のリンカーを介して連結することにより得られる。一本鎖F_vの例として、MABL-1抗体、MABL-2抗体

に由来するH鎖V領域とL鎖V領域を有するものをMABL1-scFv、MABL2-scFvとする。2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドの例としては、前記モノクローナル抗体由来のH鎖V領域とL鎖V領域を有するものをMABL1-sc(Fv)₂、MABL2-sc(Fv)₂とする。

5 これらポリペプチドを製造するにあたり、該ポリペプチドが分泌性であることを所望する場合は、そのN-末端にシグナルペプチドを付加することができる。また、該ポリペプチドの効率的精製等のために、ポリペプチド精製において有用である公知の配列、例えばFLAG配列などを挿入することができる。この場合、抗FLAG抗体を用いてダイマー形成させることもできる。

10 本発明の改変を作製するためには、これをコードするDNA、即ち一本鎖FvをコードするDNA又は再構成一本鎖ポリペプチドをコードするDNAを得る必要がある。これらのDNAは、例えばMABL1-scFv、MABL2-scFv、MABL1-sc(Fv)₂及び／又はMABL2-sc(Fv)₂の場合には前記Fv由来のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを用いて、又はこれら
15 のDNAを鋳型とし、その配列内の所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いるPCR法により増幅することにより得ることができる。

各V領域について、アミノ酸配列の一部改変を所望する場合には、PCR法を用いる公知の方法によって1又は数個のアミノ酸が改変された、即ち1もしくは
20 数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するV領域を得ることができる。特定の抗原に対して十分に活性がある改変抗体を作製するために、PCR法を用いる公知の方法によって前記V領域のアミノ酸配列の一部を改変することが望ましい。

PCRに用いるプライマーを決定するにあたり、所望のモノクローナル抗体由来のH鎖及びL鎖のタイピングをして両鎖の型を決める必要がある。MABL-
25 1抗体、MABL-2抗体の場合、MABL-1抗体はκ型L鎖及びγ1型のH鎖を有し、MABL-2抗体はκ型L鎖及びγ2a型のH鎖を有することが明らかになっている（特願平11-63557号）。前記MABL-1抗体及び／又は

MABL-2抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて増幅するには、Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991 に記載されているプライマーを用いることができる。

5 次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いてMABL-1抗体及びMABL-2抗体のL鎖V領域を増幅するため、5'-末端オリゴヌクレオチドプライマー及び3'-末端オリゴヌクレオチドプライマーを上述のように決定する。同様に、MABL-1抗体のH鎖V領域及びMABL-2抗体のH鎖V領域の増幅のため、それぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーを決定する。

10 その例として本発明においては、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素HinfI切断部位を提供する配列GATTCを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有するものを使用している。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

15 特に設計されたPCRプライマーを用いて、MABL-1、MABL-2抗体の各V領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な塩基配列を導入して、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つそれらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした（例えば、本発明ではKozak配列の導入により転写効率を上げるように工夫されている）。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たMABL-1、MABL-2抗体の各V領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター（WO 92-19759参照）に挿入した。クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法、例えば、適当なベクターに挿入し、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystems 社製）を用いて行うことができる。

25 本発明の改変抗体において、リンカー、例えばペプチドリンカーは次のように導入することができる。即ち、上述のH鎖V領域及びL鎖V領域のためのプライマーと一部相補的な配列を有し、且つ該リンカーのN-末端またはC-末端をコ

ードするようにプライマーを設計し、これを用いてPCRを行うことによって所望のアミノ酸配列および長さを有するペプチドリンカーをコードするDNAを作成することができる。そして、該DNAを介してH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを連結すれば、所望のペプチドリンカーを有する本発明の改変抗体をコードするDNAを得ることができる。さらに、1つの改変抗体をコードするDNAを得ることができれば、前記DNAを鋳型にして、そして種々のリンカー用のプライマーを設計し、これを用いてPCRを実施すれば、所望のペプチドリンカーを有する改変抗体又はリンカーを有さない改変抗体をコードするDNAは容易に得ることができる。

- 10 また、本発明における改変抗体の各鎖V領域は、従来の技術（例えば、Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 1-6 (1993)を参照のこと）を用いることによって、ヒト型化することが可能であり、また一旦ヒト型化Fv領域をコードするDNAが作製されれば、ヒト型化一本鎖Fv、ヒト型化一本鎖Fv断片、ヒト型化モノクローナル抗体あるいはヒト型化モノクローナル抗体断片は、常法に従って容易に作出する事が可能である。さらに、必要な場合、これらのV領域のアミノ酸配列の一部を改変することも可能である。

- さらに、遺伝子工学における慣用技術を用いて上述のマウス由来のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAと同様に、これらに相当する他の哺乳動物由来のDNA、例えばヒト由来のDNAを得ることができる。得られたDNAを用いて、他の哺乳動物、特にヒト由来のH鎖V領域及びL鎖V領域、ヒト由来の一本鎖Fv及びその断片、並びにヒト由来のモノクローナル抗体及びその断片を得ることができる。

- 20 以上のように、目的とする改変抗体の各鎖V領域、ヒト型化改変抗体の各鎖V領域をコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。また、常法に従って宿主を培養し、産生した再構成一本鎖Fv、再構成ヒト型化一本鎖Fv、ヒト型化モノクローナル抗体及びヒト型化モノクローナル抗体断片は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。この場合、通常

の蛋白質で用いられる分離・精製方法、例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せて、本発明の改変抗体を分離・精製することができるが、これらに限定されるものではない。

再構成一本鎖F_vを動物細胞、例えば、COS 7細胞、CHO細胞などの動物
5 培養細胞、好ましくはCHO細胞で産生する場合、無血清培地で該再構成一本鎖F_vを産生させると、培地中で効率よく該一本鎖F_vのダイマーを形成することができる。さらに、該ダイマーを精製する際には、形成されたダイマーを安定的に高収率で回収することができると共に長期間、ダイマーの状態で保存することができる。この場合に用いることができる無血清培地は、通常組み換えタンパク
10 質の産生に用いられている培地であればいかなるものでもよく、特に限定されるものではない。

本発明の改変抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好まし
15 くは、本発明の改変抗体は哺乳類細胞、例えばCOS 7細胞又はCHO細胞中で発現される。

ヒトIAPを有する細胞に結合する本発明の再構成ポリペプチドの製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば
20 大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明の再構成ポリペプチドは哺乳類細胞、例えばCOS 7細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus: HCMV) 前期 (immediate early) プロモーターを使用するのが好まし
25 い。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HC γ 1、HCMV-VL-HCK等であって、PSV2neoに由来するプラスミドベクター (国際公開公報WO 92/19759参照) が包含される。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺

伝子発現のプロモーターとしてはレトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチドチェーン・エロンゲーション・ファクター1 α (HEF-1 α) などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C.らの方法 (Nature, 277, 108-114, (1979))、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S.らの方法 (Nucleic Acids Research, 18, 5322, (1990)) に従えば容易に実施することができる。

複製起原 (ori) としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス (BPV) 等の由来のoriを用いることができ、さらに発現ベクターは選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH (3') II あるいはI (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

上述のように作成した改変抗体の抗原結合活性は、元のモノクローナル抗体の結合阻害能を指標にして評価することができる。具体的には、該モノクローナル抗体のその抗原への濃度依存的阻害作用の有無を指標にして評価する。

具体的には、本発明の改変抗体をコードするDNAを包含する発現ベクターで形質転換した動物細胞、例えばCOS7細胞又はCHO細胞を培養し、前記培養した細胞及び／又はその培養上清、又はこれらから精製した改変抗体を用いて抗原への結合を測定する。対照として発現ベクターのみで形質転換した細胞の培養上清などを用いる。抗原、例えばMABL-1抗体、MABL-2抗体の場合にはヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞に、本発明の改変抗体などの試験試料又は対照の培養上清を加え、例えばフローサイトメトリーを実施して抗原結合活性を評価する。

in vitro でのシグナル伝達誘起効果 (MABL-1抗体、MABL-2抗体の場合はアポトーシス誘導効果) は、抗原を発現する細胞又は該抗原遺伝子を導入した細胞に、前述の改変抗体の試験試料を添加し、当該細胞においてシグナル伝

達による変化（例えば、ヒト I A P 抗原特異的に細胞死を誘導するか否か）を評価する。

in vivo での評価試験は、例えば改変抗体がヒト I A P を認識する場合（例えば M A B L - 1 抗体、M A B L - 2 抗体由来の改変抗体）、アポトーシス誘起効果として、次の通りに行う。先ずヒト骨髓腫のモデルマウスを作成し、当該マウスに I A P を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体、本発明の改変抗体を静脈投与する。対照群には P B S のみを投与する。そして、アポトーシス誘起を、抗腫瘍効果としてマウス血清中のヒト I g G の量の変化及び生存期間によって評価する。

本発明の改変抗体は、2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域、好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含むものであり、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー、又は2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を連結した一本鎖ポリペプチドである。このような構成をとることで、もとのモノクローナル抗体の抗原結合部位の立体構造を模倣して、優れた抗原結合性を保持するものと考えられる。

本発明の改変抗体は、抗体分子（w h o l e I g G）と比較して顕著な低分子化が達成させているため、組織、腫瘍への移行性に優れており、さらにもとのアゴニスト抗体分子よりも高い活性を有する。このため、本発明の改変抗体の元となるモノクローナル抗体を適宜選択することによって、種々のシグナルを細胞内に伝達することがでる。故に、これを含有する医薬製剤は、シグナル伝達の誘起が疾病の治療に有効である、例えば癌、炎症、ホルモン異常、並びに白血病、悪性リンパ腫、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群および真性多血症などの血液疾患の治療薬としての利用が期待される。また、R I 標識による造影剤としての利用も期待され、R I 化合物やトキシン等の他の化合物と結合させることにより、効力を増強させることも可能である。

次に本発明を、ヒト I A P に結合するモノクローナル抗体（M A B L - 1 抗体、M A B L - 2 抗体）由来の改変抗体を例にして、下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

本発明の改変抗体の製造方法を、下記の一本鎖F_vの作製を例にして説明する。

- 5 本発明の改変抗体の製造方法において用いる、ヒトIAPに対するマウスMABL-1、MABL-2抗体を産生するハイブリドーマ、MABL-1及びMABL-2は、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、1997年9月11日に、受託番号それぞれFERM BP-6100、FERM BP-6101として国際寄託されている。

実施例1 （ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化）

ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体MABL-1及びMABL-2の可変領域をコードするDNAを次のようにしてクローン化した。

15 1. 1 メッセンジャーRNA (mRNA) の調製

ハイブリドーマMABL-1及びMABL-2からのmRNAを、mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社製) を用いて調製した。

1. 2 二本鎖cDNAの合成

- 20 約1 μ gのmRNAより Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて二本鎖cDNAを合成し、アダプターを連結した。

1. 3 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler (PERKIN ELMER 社製) を用いてPCR法を行った。

(1) MABL-1 L鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

- 25 PCR法に使用するプライマーは、アダプターの部分配列とハイブリダイズする配列番号：1に示すアダプタープライマー1 (CLONTECH 社製)、及びマウスカップ型L鎖C領域配列とハイブリダイズする配列番号：2に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

PCR溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、

0.16 mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、2.5 ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、0.2 μ Mの配列番号：1に示すアダプタープライマーと0.2 μ Mの配列番号：2に示すMKCプライマー及びMABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを含有し、
5 94℃の初期温度にて9分間そして次に94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃にて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で10分間加熱した。

(2) MABL-1 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
10 及び配列番号：3に示すMHC- γ 1 (Mouse Heavy Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 1プライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1.3 (1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

(3) MABL-2 L鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
及び配列番号：2に示すMKCプライマーを用いた。

cDNAの増幅は、MABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gの代わりにMABL-2由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを用いて増幅した点を除いて、前
20 記1.3 (1)においてMABL-1 L鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

(4) MABL-2 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
及び配列番号：4に示すMHC- γ 2aプライマー (Bio/Technology, 9, 88-89,
25 1991) を用いた。

cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 2aプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1.3 (3)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

1. 4 PCR生成物の精製

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、1 mM EDTAを含有する 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。

5 1. 5 連結及び形質転換

上記のようにして調製したMABL-1由来マウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片約140 ngをpGEM-T Easyベクター (Promega 社製) 50 ngと、30 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP及び3ユニット T4 DNAリガーゼ (Promega 社製) を含有する反応混合液中で、15℃にて3時間反応させ連結した。

次に、1 µlの上記連結混合液を大腸菌DH5αのコンピテント細胞 (東洋紡社製) 50 µlに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で2分間静置した。次いで100 µlのSOC培地 (GIBCO BRL 社製) を加え、100 µg/mlのアンピシリン (SIGMA 社製) を含有するLB (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 寒天培地上にこの大腸菌を塗布し、37℃にて終夜培養して大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を、50 µg/mlのアンピシリンを含有するLB培地3 ml中で37℃にて終夜培養し、そしてこの培養物から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。

こうして得られた、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含むプラスミドをpGEM-M1Lと命名した。

25 上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M1Hと命名した。

また、ハイブリドーマMABL-2に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコ

ードする遺伝子を含むプラスミドを精製DNA断片から作製し、p G E M - M 2 Lと命名した。

また、ハイブリドーマM A B L - 2に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むプラスミドを精製DNA断片から作製し、p G E M - M 2 Hと命名した。

実施例2 (DNAの塩基配列の決定)

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列の決定は、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem 社製) 及び ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem 社製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。

プラスミドp G E M - M 1 Lに含まれるマウスM A B L - 1抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 5に示す。

また、プラスミドp G E M - M 1 Hに含まれるマウスM A B L - 1抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 6に示す。

また、プラスミドp G E M - M 2 Lに含まれるマウスM A B L - 2抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 7に示す。

また、プラスミドp G E M - M 2 Hに含まれるマウスM A B L - 2抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 8に示す。

実施例3 (CDRの決定)

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、[Sequences of Proteins of Immunological Interest] US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトI A Pに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をK a b a tらにより作製された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめ、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示す如く

決定した。

表 1

	プラスミド	配列番号	CDR(1)	CDR(2)	CDR(3)
5	p G E M-M 1 L	5	4 3-5 8	7 4-8 0	1 1 3-1 2 1
	p G E M-M 1 H	6	5 0-5 4	6 9-8 5	1 1 8-1 2 5
	p G E M-M 2 L	7	4 3-5 8	7 4-8 0	1 1 3-1 2 1
	p G E M-M 2 H	8	5 0-5 4	6 9-8 5	1 1 8-1 2 5

10 実施例4 (クローン化cDNAの発現の確認(キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の作製))

4. 1 キメラMABL-1抗体発現ベクターの作製

キメラMABL-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスMABL-1 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpGEM-M1 L及びpGEM-M1 HをPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター(国際公開公報WO 92/19759参照)に導入した。

L鎖V領域のための前方プライマーMLS(配列番号: 9)及びH鎖V領域のための前方プライマーMHS(配列番号: 10)は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列(J. mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及びHind III制限酵素部位を有するように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーMLAS(配列番号: 11)及びH鎖V領域のための後方プライマーMHAS(配列番号: 12)は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つスプライスドナー配列及びBamHI制限酵素部位を有するように設計した。

25 PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8 ngの鋳型DNA (pGEM-M1 L及びpGEM-M1 H)を含有し、

94℃の初期温度にて9分間そして次に94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃にて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で10分間加熱した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、Hind III 及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF- κ に、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF- γ にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M1L、HEF-M1Hと命名した。

4. 2 キメラMABL-2抗体発現ベクターの作製

cDNAの修飾及びクローニングは、pGEM-M1L及びpGEM-M1Hの代わりにpGEM-M2L及びpGEM-M2Hを鋳型DNAに増幅した点を除いて、前記4. 1において記載したのと同じ方法により増幅及びクローニングを行い、DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M2L、HEF-M2Hと命名した。

4. 3 COS7細胞への遺伝子導入

キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS7細胞において試験した。

(1) キメラMABL-1抗体の遺伝子導入

HEF-M1LとHEF-M1Hベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞に同時形質転換した。各DNA (10 μ g) と、PBS中 1×10^7 細胞/mlの0.8mlをキューベツトに加え、1.5 kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の γ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

(2) キメラMABL-2抗体の遺伝子導入

キメラMABL-2抗体遺伝子の導入は、HEF-M1LとHEF-M1Hベクターの代わりにHEF-M2LとHEF-M2Hベクターを用いた点を除いて、前記4.3(1)に記載したのと同じ方法によりCOS7細胞に同時形質転換し、回収培養上清を得た。

5 4.4 フローサイトメトリー

抗原への結合を測定するため、前記COS7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 4×10^5 個に、キメラMABL-1抗体を発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはキメラMABL-2抗体を発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてヒトIgG1抗体(SIGMA社製)を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、FITC標識した抗ヒトIgG抗体(Cappel社製)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置(BECTONDICKINSON社製)にて蛍光強度を測定した。

その結果、キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体は、ヒトIAPを発現するL1210細胞に特異的に結合したことにより、これらのキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体MABL-1及びMABL-2のそれぞれのV領域の正しい構造を有することが明らかとなった(図1~3)。

実施例5 (再構成MABL-1抗体及び再構成MABL-2抗体一本鎖Fv(scFv)領域の作製)

20 5.1 再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの作製

再構成MABL-1抗体一本鎖Fvを次の様にして作製した。再構成MABL-1抗体H鎖V領域、リンカー領域、及び再構成MABL-1抗体L鎖V領域をそれぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvを作製した。この方法を図4に模式的に示す。再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの作製のために6個のPCRプライマー(A~F)を使用した。プライマーA、C及びEはセンス配列を有し、プライマーB、D及びFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマーVHS(プライマーA、配列番号:13)

は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つN c o I制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーVHAS（プライマーB、配列番号：14）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーとオーバーラップするように設計した。

- 5 リンカーのための前方プライマーLS（プライマーC、配列番号：15）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーLAS（プライマーD、配列番号：16）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。

- 10 L鎖V領域のための前方プライマーVLS（プライマーE、配列番号：17）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーVLAS-FLAG（プライマーF、配列番号：18）は、
15 L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P.ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びE c o R I制限酵素認識部位を有するように設計した。

- 20 第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれぞれ自体の相補性によりアッセンブルさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvをコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成MABL-1抗体H鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1H（実施例2を参照）、G l y G l y G l y
G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y
25 G l y G l y S e r（配列番号：19）からなるリンカー領域をコードするDNA配列（Huston, J. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドpSC-DP1、及び再構成MABL-1抗体L鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1L（実施例2を参照）をそれぞれ

れ鋳型として用いた。

第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2 mM MgCl₂、0.16 mM dNTPs、2.5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、0.4 μ Mずつの各プライマー及び5 ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

PCR生成物A-B (371 bp)、C-D (63 bp)、及びE-F (384 bp)を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製)を用いて精製し、第二PCRでアッセンブルした。第二PCRにおいて、鋳型として120 ngの第一PCR生成物A-B、20 ngのPCR生成物C-D及び120 ngのPCR生成物E-F、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2 mM MgCl₂、0.16 mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)を含有する98 μ lのPCR混合液を、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて8分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、65 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを2回反復した後、それぞれ0.4 μ MのプライマーA及びFを加えた。そして94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて1分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱し、この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を72 $^{\circ}$ Cにて7分間加熱した。

第二PCRにより生じた843 bpのDNA断片を精製し、Nco I及びEcoRIで消化し、得られたDNA断片をpSCFVT7ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクターpSCFVT7は、大腸菌ペリプラズム分泌発現系に適するpelBシグナル配列 (Lei, S. P.ら、J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987)を含んでいる。DNA配列決定の後、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpscM1と命名した (図5を参照)。本プラスミドpscM1に含まれる再構成MAB

L-1 抗体一本鎖F_vの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

次に、哺乳動物細胞にて再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vを発現するベクターを作製するため、p s c M1 ベクターをPCR法により修飾した。そして得られたDNA断片をp CHO1 発現ベクターに導入した。なお、本発現ベクターp CHO1は、DHFR-ΔE-r_vH-PM1-f (WO 92/19759 参照) から、E c o R I 及びS m a I 消化により抗体遺伝子を削除し、E c o R I -N o t I -B a m H I A d a p t o r (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つS a l I 制限酵素認識部位を有する配列番号：21に示すS a l -V H S プライマー及び後方プライマーとして第一フレームワーク配列の最後をコードするDNAにハイブリダイズする配列番号：22に示すF R H 1 a n t i プライマーを用いた。

PCR溶液100 μlは、10 μlの10×PCR Buffer II、2 mM Mg C l₂、0.16 mM d N T P s、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、0.4 μMずつの各プライマー、及び8 ngの鋳型DNA (p s c M1) を含有し、95℃の初期温度にて9分間そして次に95℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃にて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で7分間加熱した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、S a l I 及びM b o II で消化し、N末端側再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vをコードするDNA断片を得た。また、p s c M1 ベクターをM b o II 及びE c o R I で消化し、C末端側再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vをコードするDNA断片を得た。そして、S a l I -M b o II DNA断片及びM b o II -E c o R I DNA断片をp CHO1-I g s ベクターにクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをp CHOM1と命名した (図6を参照)。なお、本発現ベクターp CHO1-I g s は、哺乳動物細胞分泌発現系に適するマウス I g G 1 シグナル配列 (Nature,

332, 323-327, 1988) を含んでいる。本プラスミド p CHOM1 に含まれる再構成 MABL-1 抗体一本鎖 F_v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：23 に示す。

5. 2 再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の作製

- 5 再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v を前記 5. 1 に従って作製した。第一 PCR においては、p GEM-M1H の代わりに再構成 MABL-2 抗体 H 鎖 V 領域をコードするプラスミド p GEM-M2H (実施例 2 を参照)、及び p GEM-M1L の代わりに再構成 MABL-2 抗体 L 鎖 V 領域をコードするプラスミド p GEM-M2L (実施例 2 を参照) を使用し、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の正しいアミノ酸配列をコードする DNA 断片を含むプラスミド p scM2 を得た。本プラスミド p scM2 に含まれる再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：24 に示す。
- 10

- また、p scM2 ベクターの修飾により再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の正しいアミノ酸配列をコードする DNA 断片を含む哺乳動物細胞発現用 p CHOM2 ベクターを得た。本プラスミド p CHOM2 に含まれる再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：25 に示す。
- 15

5. 3 COS 7 細胞への遺伝子導入

- 再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の一過性発現を観察するため、p CHOM2 ベクターを COS 7 細胞において試験した。
- 20 p CHOM2 ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションにより COS 7 細胞に形質転換した。DNA (10 μg) と、PBS 中 1×10^7 細胞/ml の 0.8 ml をキュベットに加え、1.5 kV、25 μF の容量にてパルスを与えた。

- 室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10% のウシ胎児血清を含有する IMDM 培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72 時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。
- 25

5. 4 COS 7 細胞培養上清中の再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v の検出

p CHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清中における再構成MABL-2抗体一本鎖Fvをウェスタンブロッティング法により確認した。

p CHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清及びコントロールとしてp CHO1ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清についてSDS電気泳動を行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、0.05%Tween 20-PBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG抗体 (Zymed 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液 (Kirkegaard Perry Laboratories 社製) を添加し、発色させた (図7)。

その結果、p CHOM2ベクター導入COS7細胞培養上清中にのみFLAGペプチド特異的なタンパク質が検出され、この培養上清中に再構成MABL-2抗体一本鎖Fvが分泌されていることが明らかとなった。

5. 5 フローサイトメトリー

抗原への結合を測定するため、前記COS7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現するマウス白血病細胞株L1210細胞、あるいはコントロールとしてp COS1ベクターを形質転換したL1210細胞 2×10^5 個に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvを発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてp CHO1ベクターを形質転換したCOS7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、マウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識した抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACS装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvは、ヒトIAPを発現するL1210細胞に特異的に結合したことにより、この再構成MABL-2抗体一本鎖Fvがヒト Integrin Associated Protein に対するアフィニティーを有すること

が明らかとなった (図8～11)。

5. 6 Competitive ELISA

マウスモノクローナル抗体の抗原結合に対する阻害活性を指標に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvの抗原結合活性を測定した。

- 5 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した抗FLAG抗体を96ウェルプレートの各ウェルに加え、37℃にて2時間インキュベートした。洗浄後、1%BSA-PBSにてブロッキングを行った。室温にてインキュベート及び洗浄後、分泌型ヒトIAP抗原遺伝子 (配列番号: 26) を導入したCOS7細胞培養上清をPBSにて2倍希釈したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、100
- 10 ng/ml に調整したビオチン化MABL-2抗体50 μl 及び順次希釈した再構成MABL-2抗体一本鎖Fv発現COS7細胞培養上清50 μl を混和したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン (Zymed 社製) を加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、基質溶液 (SIGMA 社製) を加え、次に405 nmでの吸光度
- 15 を測定した。

- その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fv (MABL2-scFv) は、コントロールのpCHO1導入COS7細胞培養上清に比較して明らかに濃度依存的にマウスMABL-2抗体のヒトIAP抗原への結合を阻害した (図12)。
- このことから、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvは、マウスモノクローナル抗体MABL-2のそれぞれのV領域の正しい構造を有することが示唆された。
- 20

5. 7 in vitro でのアポトーシス誘起効果

- ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞、及びコントロールとしてpCOS1ベクターを遺伝子導入したL1210細胞、及びCCRF-CEM細胞を用い、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvのアポトーシス誘起作用をAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。
- 25

各細胞 1×10^5 個に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fv発現COS7細胞培養上清あるいはコントロールとしてpCHO1ベクター導入COS7細胞培養上清を終濃度50%で添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V染

色を行い、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

Annexin-V染色による解析の結果を図13～18にそれぞれ示した。ここで、図の左下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス初期の細胞を、右上の領域はアポトーシス後期の細胞を示す。その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fv (MABL2-scFv) はL1210細胞においてヒトIAP抗原特異的に著しい細胞死を誘導した (図13～16)。また、CCR F-CEM細胞においてもコントロールに比較して著しい細胞死を誘導した (図17～18)。

5. 8 CHO細胞におけるMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの発現

MABL-2抗体由来の一本鎖Fv (ポリペプチド) の恒常的発現CHO細胞株を樹立するため、pCHOM2ベクターをCHO細胞に遺伝子導入した。

pCHOM2ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に形質転換した。DNA (10 μ g) とPBSに懸濁したCHO細胞 (1 \times 10⁷細胞/ml) の0.7mlを混合したものをキューベットに加え、1.5kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。得られたクローンについて、SDS-PAGEにて目的とするタンパク質の発現を確認し、発現量の高いクローンをMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの産生細胞株として選択した。10nM methotrexate (SIGMA 社製) を含む無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5. 9 CHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製

5. 8で得た一本鎖Fv発現CHO産生株の培養上清を人工透析用カートリッジ (PAN130SF、旭メディカル) を用いて約20倍まで濃縮した。濃縮液は-20℃で保存し、精製時解凍して用いた。

CHO細胞培養上清から一本鎖F_vの精製は、Blue-sepharose、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三種のクロマトグラフィーにより行った。

(1) Blue-sepharose カラムクロマトグラフィー

培養上清の濃縮液を20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にて10倍希釈し、遠心分離 (10000 rpm × 30分) により不溶物を除去した。上清を同緩衝液で平衡化した Blue-sepharose カラム (20 ml) に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中 NaCl 濃度を0.1、0.2、0.3、0.5及び1.0 Mまで段階的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。SDS-PAGEで素通り及び各溶出画分を分析し、一本鎖F_vが確認された画分 (0.1~0.3 M NaCl 溶出画分) をプールし、Centriprep-10 (アミコン) を用いて約20倍濃縮した。

(2) ハイドロキシアパタイト

(1) の濃縮液を10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて10倍希釈し、ハイドロキシアパタイトカラム (20 ml、BioRad) に添加した。60 ml の10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を200 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した (図19)。SDS-PAGEにより各画分を分析した結果、画分A及び画分Bに一本鎖F_vが確認された。

(3) ゲル濾過

(2) の画分A及びBをそれぞれ Centriprep-10 を用いて濃縮し、0.15 M NaCl を含む20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したTSK gel G 3000 SWGカラム (21.5 × 600 mm) に添加した。クロマトグラムを図20に示す。得られた画分をSDS-PAGEで分析した結果、いずれも主要ピーク (A I、B I) が目的の一本鎖F_vであり、ゲル濾過で分析した結果、画分Aでは見かけ上の分子量約36 kD、画分Bでは同76 kDに溶出された。精製した一本鎖F_v (A I、B I) を15%-SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。サンプルを還元剤添加、非添加で処理し、Laemmliの方法に準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。

図 2 1 に示すように、A I、B I いずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約 3 5 k D に単一バンドを与えた。以上の結果から、A I は一本鎖 F v のモノマーで、B I は一本鎖 F v の非共有結合性ダイマーと考えられる。画分 A I 及び B I を T S K g e l G 3 0 0 0 S W カラム (7. 5 × 6 0 m m) を用いたゲル濾過により分析した結果、画分 A I はモノマーのピークのみ、画分 B I はダイマーのピークのみ検出された (図 2 2 を参照)。また、ダイマー画分 (画分 B I) は、全一本鎖 F v の約 4 % であった。該ダイマー画分中のダイマーは、その 9 0 % 以上が 4 ° C で 1 ヶ月以上安定的に維持された。

5. 1 0 大腸菌細胞での M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチド発現ベクターの構築

M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v を大腸菌菌体内にて効率的に発現するベクターを作製するため、p s c M 2 ベクターを P C R 法により修飾した。得られた DNA 断片を p S C F V T 7 発現ベクターに導入した。

P C R に使用するプライマーは、前方プライマーとして H 鎖 V 領域の N 末端をコードする DNA にハイブリダイズし且つ開始コドン及び N d e I 制限酵素認識部位を有する配列番号 : 2 7 に示す N d e - V H S m 0 2 プライマー及び後方プライマーとして L 鎖 V 領域の C 末端をコードする DNA にハイブリダイズし且つ 2 個の停止コドン及び E c o R I 制限酵素認識部位を有する配列番号 : 2 8 に示す V L A S プライマーを用いた。なお、前方プライマーの N d e - V H S m 0 2 は大腸菌菌体内にて効率的に発現するため、H 鎖 V 領域の N 末端をコードする DNA にハイブリダイズする部分に 5 カ所の点変異を含んでいる。

P C R 溶液 1 0 0 μ l は、1 0 μ l の 1 0 × P C R Buffer # 1、1 m M M g C l ₂、0. 2 m M d N T P s、5 ユニットの K O D DNA ポリメラーゼ (以上東洋紡社製)、1 μ M ずつの各プライマー、及び 1 0 0 n g の鋳型 DNA (p s c M 2) を含有し、9 8 ° C にて 1 5 秒間、6 5 ° C にて 2 秒間及び 7 4 ° C にて 3 0 秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを 2 5 回反復した。

P C R 生成物を Q I A q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t (Q I A G E N 社製) を用いて精製し、N d e I 及び E c o R I で消化し、得られた DNA 断片を p S C F V T 7 ベ

クターにクローニングした。なお、本発現ベクター p S C F V T 7 は N d e I 及び E c o R I で消化したことにより p e l B シグナル配列が削除されている。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを p s c M 2 D E m 0 2 と命名した (図 23 を参照のこと)。本プラスミド p s c M 2 D E m 0 2 に含まれる M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 29 に示す。

5. 1 1 大腸菌細胞における M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチドの発現

M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチドを発現する大腸菌株を得るため、p s c M 2 D E m 0 2 ベクターを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S (STRATAGENE 社製) に形質転換した。得られたクローンについて、S D S - P A G E にて目的とするタンパク質の発現を検討し、発現量の高いクローンを M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチドの産生株として選択した。

5. 1 2 大腸菌細胞産生の M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチドの精製

形質転換して得られた大腸菌のシングルコロニーを L B 培地 3 m l にて 28℃ で 7 時間培養し、これを 70 m l の L B 培地に植え継ぎ、28℃ にて一夜培養を行った。この p r e - c u l t u r e を 7 L の L B 培地に植え継ぎ、ジャーファーマンターを用いて 28℃、攪拌速度 300 r p m にて培養した。O. D. = 1.5 のときに 1 m M I P T G で誘導をかけ、その後 3 時間培養を行った。

培養液を遠心分離 (10000 × g、10 分) し、沈殿として回収した菌体に 5 m M E D T A、0.1 M N a C l、1% T r i t o n X - 100 を含む 50 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 8.0) を加え、超音波 (out put : 4、duty cycle : 70%、1 分 × 10 回) により菌体を破碎した。この懸濁液を遠心分離 (12000 × g、10 分) にかけて、沈殿として回収した封入体に 5 m M E D T A、0.1 M N a C l、4% T r i t o n X - 100 を含む 50 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 8.0) を加え、再度超音波処理 (out put : 4、duty cycle : 50%、30 秒 × 2) を行い、遠心分離 (12000 × g、10 分) により目的蛋白質を沈

殿として回収し、上清にくる夾雑蛋白質を除去した。

目的蛋白質を含んだ封入体を6M Urea、5mM EDTA、0.1M NaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解し、4M Urea、5mM EDTA、0.1M NaCl、10mM メルカプトエタノールを含む50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化したSephacryl S-300 (5×90cm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) ゲル濾過カラムに、流速5ml/分で添加し、会合している高分子量の一本鎖Fvを除去した。各画分をSDS-PAGEで分析し、純度の高い画分について、 $OD_{280}=0.25$ になるようにゲル濾過で用いた溶媒で希釈後、5mM EDTA、0.1M NaCl、0.5M Arg、2mM 還元型グルタチオン、0.2mM 酸化型グルタチオンを含む50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に対して透析を3回行うことにより、巻き戻し操作を行った。さらに0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液 (pH6.0) に対して3回透析し、溶媒交換を行った。

わずかに含まれる分子間でS-S結合で架橋された高分子を分離除去するため、0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したSuperdex 200pg (2.6×60cm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) ゲル濾過カラムに添加した。図24に示すように、高分子量の会合体と考えられるブロードなピークのあと、主要ピークとサブピークの2つのピークが検出された。SDS-PAGEによる分析 (図21参照) 及びゲル濾過の溶出位置から、主要ピークは一本鎖Fvポリペプチドのモノマーであり、サブピークは非共有結合性のダイマーと考えられる。なお、形成された非共有結合性のダイマーは、全一本鎖Fvポリペプチドの約4%であった。

5. 13 MABL-2抗体由来の精製一本鎖Fvポリペプチドの in vitro のアポトーシス誘起効果

ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞 (hIAP/L1210) を用い、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチド (MABL2-scFv) のアポトーシス誘起作用を、次の2つのプロトコールにてAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

第一のプロトコールは、h I A P / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、24時間培養した。抗体試料として、5. 9で得たCHO細胞由来MAB L 2一本鎖F vのモノマー及びダイマー、さらに5. 12で得た大腸菌細胞由来の同モノマー及びダイマー、そしてコントロールとしてマウス I g G 抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を行い、FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

また、第二のプロトコールは、h I A P / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、2時間培養後に抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を終濃度 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、更に22時間培養した。抗体試料として、5. 9で得たCHO細胞由来MAB L 2一本鎖F vのモノマー及びコントロールとしてマウス I g G 抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を行い、FACS can 装置にて蛍光強度を測定した。

Annexin-V染色による解析の結果を図25～31にそれぞれ示した。その結果、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMAB L-2抗体由来一本鎖F vポリペプチドのダイマーはコントロール (図25) と比較して著しい細胞死を誘導した (図26、27) が、CHO細胞及び大腸菌細胞産生的一本鎖F vポリペプチドのモノマーのアポトーシス誘導作用は認められなかった (図28、29)。また、抗FLAG抗体の添加により、CHO細胞産生のMAB L-2抗体由来一本鎖F vポリペプチドのモノマーはコントロール (図30) と比較して著しい細胞死を誘導した (図31)。

5. 14 s c F v / CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

(1) マウス血清ヒト I g G 定量法

マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生するヒト I g G (Mタンパク質) の定量は、以下のELISAで行った。0.1%重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したヤギ抗ヒト I g G 抗体 (BIOSOURCE 社製、Lot # 7902) $100 \mu\text{l}$ を96ウェルプレート (Nunc 社製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階希釈したマウス

血清あるいは標品としてヒト IgG (Cappel 社製、Lot # 00915) 100 μ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (BIOSOURCE 社製、Lot # 6202) 100 μ l を加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad 社製) を用いて405 nmの吸光度を測定し、標品のヒト IgG の吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒト IgG (Mタンパク質) 濃度を算出した。

(2) 投与抗体の調製

s c F v / CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーは、投与当日、濾過滅菌したPBS (－) を用いて、それぞれ0.4 mg / ml、0.25 mg / ml になるように調製し、投与試料とした。

(3) ヒト骨髓腫マウスモデルの作製

ヒト骨髓腫マウスモデルは以下のように作製した。SCIDマウス (日本クレア) を用いて in vivo 継代したKPMM2細胞 (特開平7-236475号公報) を10%ウシ胎児血清 (GIBCO BRL 社製) を含むRPMI 1640培地 (GIBCO BRL 社製) で 3×10^7 個 / ml になるように調製した。あらかじめ前日抗アシアロGM1抗体 (和光純薬社製、1バイアルを5 ml で溶解) 100 μ l を皮下投与したSCIDマウス (オス、6週齢) (日本クレア) に上記KPMM2細胞懸濁液200 μ l (6×10^6 個 / マウス) を尾静脈より注入した。

(4) 抗体投与

(3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルに対し、KPMM2細胞移植後3日目より、1日2回、3日間、上記(2)で調製した投与試料、モノマーは250 μ l、ダイマーは400 μ l を、尾静脈より投与した。対照として、濾過滅菌したPBS (－) を同様に1日2回、3日間、200 μ l、尾静脈より投与した。両群とも、1群7匹で行った。

(5) s c F v / CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果の評価

s c F v / C H Oポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫マウスモデルの抗腫瘍効果については、当該骨髓腫細胞が産生するヒト I g G (Mタンパク質) のマウス血清中の量の変化、及び生存期間で評価した。マウス血清中のヒト I g G量の変化については、K P M M 2細胞移植後 2 4 日目に血清を採取し、
5 上記 (1) で述べた E L I S Aを用いてヒト I g G量を測定した。その結果、P B S (一) 投与群では、血清ヒト I g G (Mタンパク質) 量が約 8 5 0 0 μ g / m l まで上昇しているのに対し、s c F v / C H Oダイマー投与群では対照群の 1 / 1 0 以下と顕著に低値であり、s c F v / C H Oダイマーが K P M M 2細胞の増殖を非常に強く抑制していることが示された (図 3 2)。一方、生存期間についても図 3 3 に示すとおり、s c F v / C H Oダイマー投与群では P B S (一) 投与群と比較して顕著な生存期間の延長が認められた。

以上より、s c F v / C H Oダイマーがヒト骨髓腫マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。本発明の改変抗体である s c F v / C H Oダイマーの抗腫瘍効果は、当該改変抗体が有するアポトーシス誘起作用に基づくと考えられる。
15

5. 1 5 赤血球凝集試験

赤血球凝集試験及び赤血球凝集の判定法は、続生化学実験講座の免疫生化学研究法 (日本生化学会編、東京化学同人) に準じて実施した。

健常人の血液をヘパリン処理した注射筒により採血し、P B S (一) により 3
20 回洗浄した後、P B S (一) にて最終濃度が 2 % の赤血球浮遊液を作製した。検査サンプルは、対照としてマウス I g G (Zymed 社製) を用い、M A B L - 2 抗体、C H O細胞産生の一本鎖 F v ポリペプチドモノマー、ダイマー、大腸菌産生の一本鎖 F v ポリペプチドのモノマーとダイマーを使用した。赤血球の凝集作用を検討するために、ファルコン社製の U 底の 9 6 ウェルプレートを使用し、上記
25 の抗体サンプルを 5 0 μ l / ウェル添加した中に、2 % 赤血球浮遊液をさらに 5 0 μ l 添加、混和し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーション後、4 $^{\circ}$ C で一昼夜保存し、凝集を判定した。また、対照として、P B S (一) を 5 0 μ l / ウェル添加し、抗体サンプルと同様にして凝集試験を行った。抗体の最終濃度は、マウス I

g G、MABL-2抗体は、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、一本鎖Fvは、0.004、0.04、0.4、4、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で大腸菌産生の一本鎖Fvポリペプチドのダイマーのみさらに160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量を設定した。その結果は、下記の表2に示す通り、MABL-2抗体では、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で赤血球凝集が見られたのに対し、一本鎖Fvポリペプチドではモノマー、ダイマー共に赤血球凝集は認められなかった。

表 2

赤血球凝集試験

	対照	0.01	0.1	1	10	100	$(\mu\text{g}/\text{ml})$	
mIgG	-	-	-	-	-	-		
MABL-2 (intact)	-	-	+	+++	+++	++		

	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	$(\mu\text{g}/\text{ml})$
scFv/CHO モノマー	-	-	-	-	-	-	-	
scFv/CHO ダイマー	-	-	-	-	-	-	-	

	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	160	$(\mu\text{g}/\text{ml})$
scFv/E. coli モノマー	-	-	-	-	-	-	-	-	
scFv/E. coli ダイマー	-	-	-	-	-	-	-	-	

10

実施例6 2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $\text{sc}(\text{Fv})_2$ 及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 scFv

6. 1 MABL-2抗体 $\text{sc}(\text{Fv})_2$ 発現プラスミドの構築

MABL-2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $[\text{sc}(\text{Fv})_2]$ を発現するプラスミドを作製するため、前述 pCHOM2 (MABL-2抗体由来の scFv をコードするDNAを含む) を以下に示す通りPCR法により修飾し、得られたDNA断片をpCHOM2に導入した。

PCRに使用するプライマーは、センスプライマーとしてEF1 α をコードするDNAにハイブリダイズするEF1プライマー (配列番号: 30) を使用し、

アンチセンスプライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカー領域をコードするDNA配列（配列番号：19）及びS a l I 制限酵素認識部位を有するV L L A S プライマー（配列番号：31）を使用した。

- 5 P C R 溶液 100 μ l は、10 μ l の 10 \times P C R Buffer # 1、1 mM M g C l ₂、0.2 mM d N T P s（d A T P、d G T P、d C T P、d T T P）、5 ユニットの K O D DNA ポリメラーゼ（以上東洋紡社製）、1 μ M の各プライマー、及び 100 n g の 鋳型 DNA（p C H O M 2）を含有する。P C R 溶液を 94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、50 $^{\circ}$ C にて 30 秒間及び 74 $^{\circ}$ C にて 1 分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを 30 回反復した。

- 10 P C R 生成物を Q I A q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t（Q I A G E N 社製）を用いて精製し、S a l I で消化し、得られた DNA 断片を p B l u e s c r i p t K S⁺ ベクター（東洋紡社製）にクローニングした。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを S a l I で消化し、得られた DNA 断片を S a l I で消化した p C H O M 2 に R a p i d D N A L i g a t i o n K i t（B O E H R I N G E R M A N N H E I M 社製）を用いて連結した。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを p C H O M 2（F v）₂ と命名した（図 34 を参照）。本プラスミド p C H O M 2（F v）₂ に含まれる M A B L - 2 抗体 s c（F v）₂ 領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：32 に示す。

- 20 6. 2 種々の長さのペプチドリンカーを有する M A B L - 2 抗体 s c F v 発現プラスミドの作製

種々の長さのペプチドリンカーを有し、そして [H鎖] - [L鎖]（以下 H L）、[L鎖] - [H鎖]（以下 L H）となるように V 領域を連結した s c F v を、M A B L - 2 由来の H 鎖及び L 鎖 c D N A を鋳型として以下の通りに作製した。

- 25 H L タイプの s c F v を作製するために、まず p C H O M 2（F v）₂ を鋳型として C F H L - F 1（配列番号：33）及び C F H L - R 2（配列番号：34）プライマー、C F H L - F 2（配列番号：35）及び C F H L - R 1 プライマー（配列番号：036）により K O D ポリメラーゼにて 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30

秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むH鎖、及び3'側にFLAG配列を含むL鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、CFHL-F1及びCFHL-R1プライマーを加えてさらに30サイクル反応することによりリンカーを含まないHL-0タイプのcDNAを作製した。

LHタイプのscFvを作製するために、まずMABL-2のL鎖及びH鎖V領域のcDNAを含むプラスミドpGEM-M2L及びpGEM-M2H（特願平11-63557参照）を鋳型として、それぞれT7（配列番号：37）及びCFLH-R2（配列番号：38）プライマー、CFLH-F2（配列番号：39）及びCFLH-R1（配列番号：40）プライマーを用いてKODポリメラーゼ（東洋紡）にて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むL鎖、及び3'側にFLAG配列を含むH鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたL鎖及びH鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、T7及びCFLH-R1プライマーを加えてさらに30サイクル反応した。この反応産物を鋳型とし、CFLH-F4（配列番号：41）及びCFLH-R1プライマーを用いて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行うことによりリンカーを含まないLH-0タイプのcDNAを作製した。

こうして作製したLH-0、HL-0タイプのcDNAを制限酵素EcoRI、BamHI（宝酒造）処理し、XhoI制限酵素切断部位を含まない哺乳動物発現プラスミドINPEP4にLigation High（東洋紡）を用いて導入し、Competent E. coli JM109（ニッポンジーン）を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kit（QIAGEN）にてプラスミドを精製した。こうしてプラスミドpCF2LH-0及びpCF2HL-0を作製した。

次に、リンカーサイズの異なる発現プラスミドを作製するためにHLタイプではpCF2HL-0を鋳型としてCFHL-X3（配列番号：42）、CFHL-

X 4 (配列番号: 4 3)、CFHL-X 5 (配列番号: 4 4)、CFHL-X 6 (配列番号: 4 5)、又はCFHL-X 7 (配列番号: 4 6) のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的なBGH-1 (配列番号: 4 7) プライマーを用いてKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、得られた反応産物を制限酵素XhoI、BamHI (宝酒造) にて処理した。得られた断片をpCF2HL-0のXhoI、BamHIサイトにLigation High (東洋紡) を用いて導入し、Competent E. coli JM109を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドpCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6及びpCF2HL-7を作製した。更にCOS7細胞での一過的発現に用いる発現プラスミドを作製するために、pCF2HL-0、pCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6及びpCF2HL-7を制限酵素EcoRI及びBamHI (宝酒造) にて処理し、約800bpの断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミドpCOS1のEcoRI及びBamHIサイトにLigation High を用いて導入し、Competent E. coli DH5α (東洋紡) を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドCF2HL-0/pCOS1、CF2HL-3/pCOS1、CF2HL-4/pCOS1、CF2HL-5/pCOS1、CF2HL-6/pCOS1及びCF2HL-7/pCOS1を作製した。代表的な例として、プラスミドCF2HL-0/pCOS1の構造を図35に示し、これに含まれるMABL2-scFv<HL-0>の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 48に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図36に示す。

また、リンカーサイズの異なるLHタイプの発現プラスミドを作製するため、pCF2LH-0を鋳型としてCFLH-X3 (配列番号: 49)、CFLH-X4 (配列番号: 50)、CFLH-X5 (配列番号: 51)、CFLH-X6 (配

列番号：52)又はCF LH-X7(配列番号：53)のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的なBGH-1プライマーを用いてKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、得られた反応産物を制限酵素XhoI、BamHIにて処理した。得られた断片をpCF2 LH-0のXhoI、BamHIサイトにLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α(東洋紡)を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kitにてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドpCF2 LH-3、pCF2 LH-4、pCF2 LH-5、pCF2 LH-6及びpCF2 LH-7を作製した。更にCOS7細胞での一過的発現に用いる発現プラスミドを作製するために、pCF2 LH-0、pCF2 LH-3、pCF2 LH-4、pCF2 LH-5、pCF2 LH-6及びpCF2 LH-7を制限酵素EcoRI及びBamHI(宝酒造)にて処理し、約800bpの断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミドpCOS1のEcoRI及びBamHIサイトにLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α(東洋紡)を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kitにてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドCF2 LH-0/pCOS1、CF2 LH-3/pCOS1、CF2 LH-4/pCOS1、CF2 LH-5/pCOS1、CF2 LH-6/pCOS1及びCF2 LH-7/pCOS1を作製した。代表的な例として、プラスミドCF2 LH-0/pCOS1の構造を図37に示し、これに含まれるMABL2-scFv<LH-0>の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：54に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図38に示す。

6.3 COS7細胞におけるscFv及びsc(Fv)₂の発現

(1) 有血清培地での培養上清の調製

HLタイプ、LHタイプscFv及びsc(Fv)₂の発現のために、COS7細胞(JCRB9127、ヒューマンサイエンス振興財団)での一過的発現を行った。COS7細胞は10%牛胎児血清(HyClone)を含むDMEM培地(GIBCO

BRL 社製) にて、37℃の炭酸ガス恒温槽中で経代培養した。

6. 2で構築したCF2HL-0, 3~7/pCOS1、もしくはCF2LH-0, 3~7/pCOS1又はpCHOM2(Fv)₂ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞にトランス
5 フェクションした。

DNA (10 µg) とDMEM (10% FBS, 5 mM BES (SIGMA 社)) 培地中 2×10^7 細胞/ml の0.25 ml をキュベットに加え、10分間静置の後に0.17 kV、950 µFの容量にてパルスを与えた。10分間静置の後、エレクトロポレーションされた細胞をDMEM (10% FBS) 培地に混合し、
10 75 cm³ フラスコに加えた。72時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.22 µm ボトルトップフィルター (FALCON) にて濾過し、これを培養上清 (CM) とした。

(2) 無血清培地での培養上清の調製

上記 (1) と同様の方法でトランスフェクションした細胞をDMEM (10% FBS) 培地に加え75 cm³ フラスコにて一夜培養した後、培養上清を捨て、PBSにて洗浄後、CHO-S-SFM II 培地 (GIBCO BRL 社製) を添加した。72時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.22 µm ボトルトップフィルターにて濾過し、CMを得た。

6. 4 COS7 CM中のscFv及びsc(Fv)₂の検出

前記6. 3 (2) で調製したCOS7のCM中における種々のMABL2-scFv及びsc(Fv)₂のポリペプチドを下記の通りにウェスタンブロッティング法により検出した。

各COS7 CMについてについてSDS-PAGEを行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、TBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (Jackson Immuno Research 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液を添加し、発色させた (図39)。

6. 5 フローサイトメトリー

MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、前記 6. 3 (1) にて調製した COS 7 細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト IAP を発現する
5 マウス白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞 2×10^5 個に、実施例 6. 3 (1) で得られた培養上清あるいは対照として COS 7 細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗 FLAG 抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、
10 FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、各 COS 7 培養上清中の種々の長さのペプチドリンカーを有する MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ は、ヒト IAP に対して高い親和性を有することが示された (図 40 a 及び b)。

6. 6 in vitro でのアポトーシス誘起効果

15 前記 1. 3 (1) にて調製した COS 7 細胞培養上清について、ヒト IAP を遺伝子導入した L 1 2 1 0 細胞 (h IAP/L 1 2 1 0) に対するアポトーシス誘導作用を Annexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

h IAP/L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個に、各ベクターを形質転換した COS 7
20 細胞培養上清あるいはコントロールとして COS 7 細胞培養上清を終濃度 10 % で添加し、24 時間培養した。その後、Annexin-V/PI 染色を行い、FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、COS 7 CM 中の s c F v <HL 3, 4, 6, 7、LH 3, 4, 6, 7> 及び s c (F v)₂ は h IAP/L 1 2 1 0 細胞に対して顕著な細胞死を誘導した。
25 得られた結果を図 41 にそれぞれ示す。

6. 7 MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ の CHO 細胞用発現ベクターの構築

前記 MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ を培養上清から精製することを目的

として、これらをCHO細胞にて発現させるための発現ベクターを以下のように構築した。

前記1. 2にて調製したpCF2HL-0, 3~7及びpCF2LH-0, 3~7のEcoRI-BamHI断片を、CHO細胞用発現ベクターpCHO1のEcoRI及びBamHI部位にLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5 α を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)にてプラスミドを精製した。このようにして発現プラスミドpCHOM2HL-0, 3~7及びpCHOM2LH-0, 3~7を作製した。

6. 8 MABL2-scFv<HL-0, 3~7>、MABL2-scFv<LH-0, 3~7>及びsc(Fv)₂発現CHO細胞の作製並びにその培養上清の調製

前記1. 7にて構築した発現プラスミドpCHOM2HL-0, 3~7及びpCHOM2LH-0, 3~7並びにpCHOM2(Fv)₂ベクターを以下の通りにCHO細胞に形質転換し、各改変抗体を恒常的に発現するCHO細胞を作製した。その代表的な例としてMABL2-scFv<HL-5>、sc(Fv)₂を恒常的に発現するCHO細胞の作製を下記に示す。

発現プラスミドpCHOM2HL-5及びpCHOM2(Fv)₂を制限酵素PvuIにて消化して直鎖状にし、これらをGene Pulser装置 (BioRad 社製)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞にトランスフェクションした。DNA (10 μ g)と、PBS中1 \times 10⁷細胞/mlの0.75mlをキュベットに加え、1.5kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸含有 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製)に加え培養した。一夜培養後、培養上清を除去し、PBSにてリンスした後、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製)を加え培養した。約2週間培養後、methotrexate (SIGMA 社製)を終濃度10nMで含有する培地で更に培養し、その後50nM、そして100nMと濃度を順次上げて培養を続けた。こうして得られた細胞をローラーボトル中で無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO

BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に $0.20 \mu\text{m}$ フィルターにて濾過し、それぞれの CM を得た。

同様にして、MABL 2-s c F v < HL-0, 3, 4, 6, 7 > 及び < LH-0, 3, 4, 5, 6, 7 > を恒常的に発現する CHO 細胞及びそれらの CM を得た。

6. 9 MABL 2-s c F v < HL-5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の精製

下記の 2 種類の精製法により前記 6. 8 で得られた CM から MABL 2-s c F v < HL-5 > 及び s c (F v)₂ の精製を行った。

< 精製法 1 > HL-5 及び s c (F v)₂ を、そのポリペプチドの C 末端の F l a g 配列を利用した抗 F l a g 抗体アフィニティカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を用いて精製した。150 mM NaCl を含む 50 mM T r i s 塩酸緩衝液、pH 7.5 (TBS) で平衡化した抗 Flag M2 Affinity gel (SIGMA) で作成したカラム (7.9 ml) に前記 6. 8 で得られた CM (1 L) を添加し、TBS でカラムを洗浄後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液、pH 3.5 で s c F v をカラムから溶出させた。得られた画分を SDS/PAGE で分析し、s c F v の溶出を確認した。s c F v 画分を終濃度が 0.01 % となるように T w e e n 20 を加え、Centricon-10 (MILLIPORE) で濃縮した。濃縮液を 150 mM NaCl 及び 0.01 % T w e e n 20 を含む 20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0 で平衡化した TSK gel G3000 SW カラム (7.5 × 600 mm) にかけた。流速 0.4 ml/min で s c F v は 280 nm の吸収で検出した。HL-5 は主要ピークとしてダイマーの位置に、s c (F v)₂ はモノマーの位置にそれぞれ溶出された。

< 精製法 2 > HL-5 及び s c (F v)₂ をイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三工程で精製した。イオン交換クロマトグラフィーでは、HL-5 では Q Sepharose fast flow カラム (ファルマシア) を s c (F v)₂ では SP-sepharose fast flow カラムを用い、第二工程以降は HL-5 と s c (F v)₂ で同じ条件を用いた。

(第一工程) HL-5

HL-5 の CM は、0.02 % T w e e n 20 を含む 20 mM T r i s 塩酸緩

衝液、pH 9.0で2倍希釈した後に、1M TrisでpHを9.0に調整した。この後、0.02% Tween 20を含む20mM Tris 塩酸緩衝液、pH 8.5で平衡化したQ Sepharose fast flow カラムにかけ、同緩衝液中0.1Mから0.55MまでのNaClの直線濃度勾配でカラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、HL-5を含む画分を集め、第二工程のヒドロキシアパタイトにかけた。

(第一工程) $s_c(Fv)_2$

$s_c(Fv)_2$ のCMは、0.02% Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH 5.5で2倍希釈した後に、1M酢酸でpHを5.5に調整した。0.02% Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH 5.5で平衡化したSP-Sepharose fast flow カラムにかけ、同緩衝液中、NaCl濃度を0から0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、 $s_c(Fv)_2$ を含む画分を集め、第二工程のヒドロキシアパタイトにかけた。

(第二工程) HL-5及び $s_c(Fv)_2$ のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー

第一工程で得られたHL-5画分及び $s_c(Fv)_2$ 画分をそれぞれ0.02% Tween 20を含む10mM リン酸緩衝液、pH 7.0で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (BioRad、タイプI) に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。各画分をSDS/PAGEで分析し、所望のポリペプチドが含まれる画分を集めた。

(第三工程) HL-5及び $s_c(Fv)_2$ のゲル濾過

第二工程で得られた各画分をそれぞれ Centriprep-10 (MILLIPORE) で濃縮し、0.02% Tween 20及び0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液、pH 6.0で平衡化したSuperdex 200カラム (2.6×60cm、ファルマシア) にかけた。HL-5はダイマーに位置に、 $s_c(Fv)$ HL-5及び $s_c(Fv)_2$ はモノマーの位置にそれぞれ主要ピークとして溶出された。

いずれの精製法においても、HL-5モノマーは殆ど検出されなかったことから、一本鎖Fvのリンカーのアミノ酸残基数が5個程度であれば、効率的に一本鎖Fvのダイマーが形成できることが判明した。HL-5ダイマーおよびsc(Fv)₂はいずれも精製された後も4℃で1ヶ月間安定的に維持された。

5 6. 10 精製scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の抗原結合活性評価

精製されたMABL2-scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、フローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 (hIAP/L1210) 又は対照としてpCOS1ベクターをトランスフェクションしたL1210細胞 (pCOS1/L1210) 2×10⁵個に、10μg/mlの精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー、MABL2-sc(Fv)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体MABL-2、陰性対照としてマウスIgG (Zymed 社製) を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、10μg/mlのマウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

その結果、精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー及びMABL2-sc(Fv)₂はhIAP/L1210細胞に特異的に結合したことにより、scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂がヒトIAPに対して高い親和性を有することが示された (図42)。

6. 11 精製scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の in vitro アポトーシス誘起効果

25 精製したMABL2-scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞 (hIAP/L1210) 及びヒト白血病細胞株CCRF-CEMに対するアポトーシス誘導作用をAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

h I A P / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個あるいは C C R F - C E M 細胞 1×10^5 個に、精製 M A B L 2 - s c F v < H L 5 > のダイマー、M A B L 2 - s c (F v)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体 M A B L - 2、陰性対照としてマウス I g G を様々な濃度で添加し、24 時間培養した。その後、A n n e x i n - V 染色を行い、F A C S c a n 装置 (B E C T O N D I C K I N S O N 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、M A B L 2 - s c F v < H L 5 > のダイマー及び M A B L 2 - s c (F v)₂ は h I A P / L 1 2 1 0、C C R F - C E M の両細胞に対して濃度依存的に細胞死を誘導した (図 4 3)。この結果、M A B L 2 - s c F v < H L 5 > のダイマー及び M A B L 2 - s c (F v)₂ は、もとのモノクローナル抗体 M A B L - 2 と比較して改善されてたアポトーシス誘導作用を有することが示された。

6. 1 2 精製 s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の赤血球凝集試験

実施例 5. 1 5 に従って、種々の濃度の精製した s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の血液凝集試験を実施した。

モノクローナル抗体 M A B L - 2 (陽性対照) では血液凝集が起こるのに対して、一本鎖抗体の M A B L 2 - s c (F v)₂ 及び M A B L 2 - s c (F v) < H L 5 > は凝集しなかった。また、M A B L - 2 抗体を用いた緩衝液の差もほとんどみられなかった。その結果を下記の表 3 に示す。

表 3

ヒト赤血球凝集試験

希釈液: PBS														(μg/ml)		
MAB2-sc(Fv)2	cont	28.9	14.45	7.225	3.6125	1.8063	0.9031	0.4516	0.2258	0.1129	0.0564	0.0282	0.0141	0.0071	0.0035	0.0018
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAB2-sc(Fv)CHL5	cont	28.0	14.0	7.0	3.5	1.75	0.875	0.4375	0.2188	0.1094	0.0547	0.0273	0.0137	0.0068	0.0034	0.0017
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAB2 (intact)	cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
希釈液: Acetate Buffer																
MAB2 (intact)	cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

6. 1 3 精製 s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ のヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

実施例 6. 8 及び 6. 9 にて作製、精製した s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ について、その抗腫瘍効果を試験した。具体的には実施例 5. 1 4 (3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルを用いて、マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生する M タンパク質を E L I S A により定量し、併せてマウスの生存日数を記録した。そして、血清中の M タンパク質量の変化および生存日数により、s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の抗腫瘍効果を評価した。

10 なお、本試験において H L - 5 及び s c (F v)₂ は、v e h i c l e (1 5 0 m M N a C l , 0 . 0 2 % T w e e n 及び 2 0 m M 酢酸緩衝液, p H 6 . 0) 中の 0 . 0 1 、 0 . 1 又は 1 m g / m l の溶液として、投与量が 0 . 1 、 1 または 1 0 m g / k g になるようにマウスに投与した。また、対照は v e h i c l e のみを投与した。

15 ヒト骨髓腫細胞移植後 2 6 日目に血清を採取し、血清中の M タンパク質量を E L I S A により実施例 5. 1 4 に従って測定した。その結果、H L - 5 投与群及びダイマー及び s c (F v)₂ 投与群共に、血清中の M タンパク質量が投与量依存的に減少していた (図 4 4 を参照) 。また、その生存期間については、H L - 5 投与群 (図 4 5) 及び s c (F v)₂ 投与群 (図 4 6) 共に対照 (v e h i c l e 投与群) と比較して有意な生存期間の延長が観察された。これらの結果は、本発明の
20 H L - 5 及び s c (F v)₂ がインビボにおいても優れた抗腫瘍作用を有することを示している。

実施例 7 ヒト M P L に対するヒト抗体 1 2 B 5 の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域を含む一本鎖 F v

25 ヒト M P L に対するヒトモノクローナル抗体 1 2 B 5 の V 領域をコードする D N A を次のようにして構築した。

7. 1 1 2 B 5 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の構築

ヒト M P L に結合するヒト抗体 1 2 B 5 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子は、該

遺伝子の塩基配列（配列番号 55）を用いて、その 5' 末端にヒト抗体遺伝子由来のリーダー配列（配列番号 56）（Eur. J. Immunol. 1996; 26: 63-69）を連結させることで設計した。設計した塩基配列はそれぞれ 15 b p のオーバーラップ配列を持つように 4 本のオリゴヌクレオチド（12B5VH-1、12B5VH-2、12B5VH-3、12B5VH-4）に分割し、12B5VH-1（配列番号 57）及び 12B5VH-3（配列番号：59）はセンス方向で、12B5VH-2（配列番号：58）及び 12B5VH-4（配列番号：60）はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセムブリさせた後、外側プライマー（12B5VH-S 及び 12B5VH-A）を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12B5VH-S（配列番号：61）は前方プライマーでリーダー配列の 5' 末端にハイブリダイズし、且つ Hind III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また 12B5VH-A（配列番号：62）は後方プライマーで H 鎖 V 領域の C 末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つ スプライドナー配列ならびに BamHI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR 溶液 100 μ l は、5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer II、1.5 mM MgCl₂、0.08 mM dNTPs（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、5 ユニットの DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上 PERKIN ELMER 社製）、2.5 μ M ずつの合成オリゴヌクレオチド 12B5VH-1～4 を含有し、94 $^{\circ}$ C の初期温度にて 9 分間そして次に 94 $^{\circ}$ C にて 2 分間、55 $^{\circ}$ C にて 2 分間及び 72 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 2 回反復した後、100 pmol ずつの外側プライマー 12B5VH-S 及び 12B5VH-A を加え、さらに 94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間及び 72 $^{\circ}$ C にて 1 分間のサイクルを 35 回反復した後、反応混合物を更に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。

PCR 生成物は 1.5% 低融点アガロースゲル（Sigma 社製）を用い精製した後、制限酵素 BamHI 及び Hind III で消化し、ヒト H 鎖発現ベクター HEF-g γ 1 にクローニングした。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを HEF-12B5H-g γ 1 と命名した。

さらに、HEF-12B5H- γ 1を制限酵素EcoRIならびにBamHIで消化し、12B5VHをコードする遺伝子を調製した後、ヒトFabH鎖発現ベクターpCOS-Fdに挿入しpFd-12B5Hを得た。なお、ヒトFabH鎖発現ベクターはヒト抗体H鎖V領域と定常領域をコードする遺伝子間に存在するイントロン領域ならびにヒトH鎖定常領域の一部をコードする遺伝子を含むDNA（配列番号63）をPCR法を用い増幅した後、動物細胞発現ベクターpCOS1に挿入することで構築したベクターである。ヒトH鎖定常領域はHEF- γ 1を鋳型とし、上記と同様の条件下にて遺伝子の増幅を行い、前方プライマーとしてイントロン1の5'端の配列とハイブリダイズし、且つEcoRI及びBamHI制限酵素認識配列を有するように設計したG1CH1-S（配列番号64）を、後方プライマーとしてヒトH鎖定常領域CH1ドメインの3'端のDNAにハイブリダイズし、且つヒンジ領域の一部をコードする配列、二個の停止コドンおよびBglII制限酵素認識部位を有するように設計したG1CH1-A（配列番号65）を用いた。

プラスミドHEF-12B5H- γ 1及びpFd-12B5Hに含まれる再構成12B5H鎖可変領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：66に示す。

7. 2 12B5L鎖V領域をコードする遺伝子の構築

ヒトMPLに結合するヒト抗体12B5L鎖V領域をコードする遺伝子は、該遺伝子の塩基配列（配列番号67）を用い、その5'末端にヒト抗体遺伝子3D6（Nuc. Acid Res. 1990: 18; 4927）由来のリーダー配列（配列番号68）を連結させることで設計した。設計した塩基配列は上記と同様にそれぞれ15bpのオーバーラップ配列を持つように4本のオリゴヌクレオチド（12B5VL-1、12B5VL-2、12B5VL-3、12B5VL-4）に分割し、それぞれ合成した。12B5VL-1（配列番号：69）及び12B5VL-3（配列番号：71）はセンス配列、12B5VL-2（配列番号：70）及び12B5VL-4（配列番号：72）はアンチセンス配列を有し、各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセムブリさせた後、外側プライマー（12B5VL-S及び12B5VL-A）を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12

B 5 V L - S (配列番号 : 7 3) は前方プライマーでリーダー配列の 5' 末端にハイブリダイズし、且つ H i n d III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また 1 2 B 5 V L - A (配列番号 : 7 4) は後方プライマーで L 鎖 V 領域の C 末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つスプライスドナー配列ならびに B a m H I 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

P C R 反応は上記と同様に行い、P C R 生成物は 1.5 % 低融点アガロースゲル (Sigma 社製) を用い精製した後、制限酵素 B a m H I 及び H i n d III で消化し、ヒト L 鎖発現ベクター H E F - g κ にクローニングした。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを H E F - 1 2 B 5 L - g κ と命名した。本プラスミド H E F - 1 2 B 5 L - g κ に含まれる再構成 1 2 B 5 L 鎖 V 領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号 : 7 5 に示す。

7. 3 再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v (s c F v) の作製

再構成 1 2 B 5 抗体一本鎖 F v は 1 2 B 5 V H - リンカー - 1 2 B 5 V L の順とし、その C 末端には検出及び精製を容易にするために F L A G 配列 (配列番号 : 7 6) を付加することで設計した。さらに、リンカー配列は (G l y₄ S e r)₃ の 1 5 アミノ酸からなるリンカー配列を用い、再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v (s c 1 2 B 5) を構築した。

(1) 1 5 アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v の作製

1 5 アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成 1 2 B 5 抗体一本鎖 F v をコードする遺伝子は 1 2 B 5 H 鎖 V 領域、リンカー領域、及び 1 2 B 5 L 鎖 V 領域をそれぞれ P C R 法を用いて増幅し、連結することにより構築した。この方法を図 4 7 に模式的に示す。再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v の作製のために 6 個の P C R プライマー (A ~ F) を使用した。プライマー A、C 及び E はセンス配列を有し、プライマー B、D 及び F はアンチセンス配列を有する。

H 鎖 V 領域のための前方プライマー 1 2 B 5 - S (プライマー A、配列番号 : 7 7) は、H 鎖リーダー配列の 5' 末端にハイブリダイズし且つ E c o R I 制限酵素認識部位を有するように設計した。H 鎖 V 領域のための後方プライマー H u V

HJ3（プライマーB、配列番号：78）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズするように設計した。

リンカーのための前方プライマーRHuJH3（プライマーC、配列番号：79）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーRHuVK1（プライマーD、配列番号：80）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。

L鎖V領域のための前方プライマーHuVK1.2（プライマーE、配列番号：81）はL鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマー12B5F-A（プライマーF、配列番号：82）は、L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P.ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びNotI制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセムブリさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、15アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成12B5一本鎖Fvをコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成12B5H鎖V領域をコードするプラスミドHEF-12B5H-gγ1（実施例7.1を参照）、Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Serからなるリンカー領域をコードするDNA配列（配列番号：83）（Huston, J. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドpSCFVT7-hM21（ヒト型化ONS-M21抗体）（Ohtomo, T.ら、Anticancer Res. 18 (1998), 4311-4316）、及び再構成12B5L鎖V領域をコードするプラスミドHEF-12B5L-gκ（実施例7.2を参照）をそれぞれ鋳型として用いた。

第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、100pmole ずつの各プライマー及び100ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

PCR生成物A-B、C-D、及びE-Fは第二PCRでアッセンブリした。第二PCRにおいて、鋳型として1 μ lの第一PCR反応物A-B、0.5 μ lのPCR反応物C-D及び1 μ lのPCR反応物E-F、10 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)を含有する98 μ lのPCR混合液を、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、65 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを2回反復した後、それぞれ100pmole ずつのプライマーA及びFを加えた。そして94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を72 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した。

第二PCRにより生じたDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、EcoRI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO1ベクターおよびpCOS1ベクター (特願平8-255196) にクローニングした。なお、本発現ベクターpCHO1は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (WO 92/19759 参照) から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。DNA配列決定の後、再構成12B5一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHO-sc12B5及びpCOS-sc12B5と命名した。本プラスミドpCHO-sc12B5及びpCOS-sc12B5に含まれる再構成12B5一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 84に示す。

7. 4 動物細胞を用いた各12B5抗体 (IgG、Fab) 及び一本鎖Fvが

リペプチドの発現

12B5抗体 (IgG、Fab) 及び12B5抗体由来の一本鎖Fv (ポリペプチド) はCOS-7細胞又はCHO細胞を用い発現させた。

COS-7細胞を用いた一過的な発現は次のようにして行った。すなわち、
5 Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。12B5抗体 (IgG) の発現には前述の発現ベクターHEF-12B5H-g γ 1及びHEF-12B5L-g κ 各10 μ gずつを、12B5Fab断片の発現にはpFd-12B5HとHEF-12B5L-g κ 各10 μ gずつを、一本鎖Fvの発現にはpCOS-sc12B5 (10 μ g) をPBSに
10 懸濁したCOS-7細胞 (1 \times 10⁷細胞/ml) 0.8mlに混合し、キュベットに加え、1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するDMEM培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。終夜培養後、細胞をPBSで一回洗浄し、さらに無血清培地CHO-S-SFM II 培地を加え、
15 さらに2日間培養した。培養上清を遠心し細胞破砕物を除去した後、0.22 μ mのフィルターを通すことで調製した。

また、12B5抗体由来の一本鎖Fv (ポリペプチド) の恒常的発現CHO細胞株を樹立するため、pCHO-sc12B5発現ベクターを下記のようにCHO細胞に遺伝子導入した。

20 すなわち、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いたエレクトロポレーション法により発現ベクターをCHO細胞に導入した。制限酵素PvuIで消化し直鎖状にしたDNA (100 μ g) とPBSに懸濁したCHO細胞 (1 \times 10⁷細胞/ml) の0.8mlを混合したものをキュベットに加え氷中で10分間静置した後、1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間
25 の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するCHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。培養2日後に5nM メトトレキサート (SIGMA 社製) ならびに10%ウシ胎児血清を含むCHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養した。得られたクローンについて

発現量の高いクローンを12B5一本鎖Fvの産生細胞株として選択した。10 nMメトトレキサート (SIGMA 社製) を含む無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して培養上清を得た。

5 7. 5 CHO細胞産生の12B5由来の一本鎖Fvの精製

7. 4で得られた12B5一本鎖Fv発現CHO産生株の培養上清からの精製は、抗FLAG抗体カラム及びゲル濾過カラムにより行った。

(1) 抗FLAG抗体カラム

培養上清は、PBSで平衡化した抗FLAG M2アフィニティーゲル (SIGMA 社製) に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液を0.1 Mグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) でカラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出画分は、溶出後直ちに1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて中和した。SDS-PAGEで溶出画分を分析し、一本鎖Fvが確認された画分をCentricon-10 (MILLIPORE 社製) を用いて濃縮した。

15 (2) ゲル濾過

(1) の濃縮液は、0.01% Tween 20を含むPBSで平衡化したSuperdex 200カラム (10×300 mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) に添加した。

sc12B5は2つのピーク (A、B) に分かれて溶出した (図48を参照)。画分A、Bを14%-SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。サンプルを還元剤添加、非添加で処理し、Laemmliの方法に準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。図49に示すように、画分A、Bいずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約31 kDに単一バンドを与えた。画分A及びBをSuperdex 200 PC 3.2/30 (3.2×300 mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) を用いたゲル濾過により分析した結果、画分Aでは見かけ上の分子量約44 kD、画分Bでは同22 kDに溶出された (図50 a 及び b を参照)。以上の結果から、画分Aはsc12B5一本鎖Fvの非共有結合性ダイマーで、Bはモノマーである。

7. 6 各種一本鎖FvのTPO様アゴニスト活性の測定

ヒトTPO受容体(MPL)を発現するBa/F3細胞(BaF/mp1)に対する増殖活性を測定することによって、抗MPL一本鎖抗体のTPO様活性を評価した。BaF/Mp1細胞を、10%ウシ胎児血清(HyClone社製)を含むRPMI 1640培地(GIBCO社製)で2回洗浄したのち、 5×10^5 細胞/mlの細胞密度になるように培地に懸濁した。抗MPL一本鎖抗体またはヒトTPO(R&D Systems社製)を培地で適当に希釈し、細胞懸濁液50 μ lに抗体またはヒトTPO希釈液50 μ lを加えて96穴マイクロウェル平底プレート(Falcon社製)に分注し、CO₂インキュベーター(CO₂濃度:5%)で24時間培養した。培養後、WST-8試薬(生細胞数測定試薬SF:ナカライテスク社製)を10 μ l加え、直後に蛍光吸光度計SPECTRA Fluor(TECAN社製)を用いて測定波長450nm、対照波長620nmの吸光度を測定した。CO₂インキュベーター(CO₂濃度:5%)で2時間インキュベートした後、SPECTRA Fluorを用いて再度測定波長450nm、対照波長620nmの吸光度を測定した。WST-8試薬は生細胞数に応じて波長450nmの発色反応を呈することから、2時間の吸光度変化を指標にBaF/Mp1増殖活性を評価した。

各種12B5抗体分子を発現させたCOS-7細胞の培養上清を用い、MPLに対するアゴニスト活性を測定した結果、図51に示すように抗原結合部位が二価である12B5IgGでは濃度依存的に吸光度の上昇が認められTPO様のアゴニスト活性を示したのに対し(ED₅₀;29nM)、抗原結合部位が一価である12B5Fabのアゴニスト活性は非常に弱いものであった(ED₅₀;34,724nM)。それに対し、Fabと同様に抗原結合部位が一価である一本鎖Fv(sc12B5)においてはED₅₀値が75nMと強いアゴニスト活性が認められた。しかしながら、一本鎖FvではH鎖、L鎖各可変領域は非共有結合で介合しているために、溶液中で各可変領域が解離し他の分子の可変領域と介合し二量体等の多量体を形成することが知られている。そこで、ゲル濾過を用い精製sc12B5の分子量を測定した結果、確かに単量体(モノマー)と二量体(ダイマー)と考えられる分子が認められた(図48を参照)。続いて、モノマーとダイ

マーの s c 1 2 B 5 をそれぞれ単離し（図 5 0 を参照）、それらの M P L に対するアゴニスト活性を測定した結果、図 5 1 及び 5 2 に示すように s c 1 2 B 5 モノマーでは E D 5 0 値が 4 4 3 8 . 7 n M と C O S - 7 細胞の培養上清を用いた結果に比べ、アゴニスト活性の減弱が確認された。それに対し、二価の抗原結合部位を持つ一本鎖 F v （ s c 1 2 B 5 ダイマー）では一価の s c 1 2 B 5 に対し約 4 0 0 倍強いアゴニスト活性を示した（E D 5 0 ; 1 0 . 1 n M）。さらに、二価の一本鎖 F v ではヒト T P O ならびに 1 2 B 5 I g G のアゴニスト活性と同等もしくはそれ以上のアゴニスト活性を示した。

10 図面の簡単な説明

図 1. ヒト I g G 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（h I A P / L 1 2 1 0）に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

15 図 2. キメラ M A B L - 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（h I A P / L 1 2 1 0）に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 3. キメラ M A B L - 2 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（h I A P / L 1 2 1 0）に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

20 図 4. 本発明にかかる一本鎖 F v の作成方法を模式的に示す図である。

図 5. 本発明の一本鎖 F v をコードする D N A を、大腸菌にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

図 6. 本発明の一本鎖 F v をコードする D N A を、哺乳動物細胞にて発現させるために使用する発現プラスミドの一例の構造を示す。

25 図 7. 実施例 5. 4 で得られたウエスタンブロットの結果を示す写真である。左側より、分子量マーカー（上から 9 7 . 4、6 6、4 5、3 1、2 1 . 5、1 4 . 5 k D a を示す）、p C H O 1 導入 C O S 7 細胞培養上清、p C H O M 2 導入細胞培養上清。p C H O M 2 導入細胞培養上清に再構成 M A B L - 2 抗体一本鎖 F v

(矢印) が明らかに含まれていることを示す。

図 8. コントロールとしての pCHO1/COS7 細胞培養上清の抗体は、コントロールとしての pCOS1/L1210 細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

5 図 9. MABL2-scFv/COS7 細胞培養上清の抗体は、コントロールとしての pCOS1/L1210 細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

10 図 10. コントロールとしての pCOS1/COS7 細胞培養上清の抗体は、hIAP/L1210 細胞に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 11. MABL2-scFv/COS7 細胞培養上清の抗体は、hIAP/L1210 細胞に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

15 図 12. 実施例 5. 6 で示す Competitive ELISA の結果を示す図であり、本発明の一本鎖 Fv (MABL2-scFv) の抗原結合活性を、コントロールとしての pCHO1/COS7 細胞培養上清と比較して、マウスモノクローナル抗体 MABL-2 の抗原結合に対する阻害を指標として示す図である。

20 図 13. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、コントロールとしての pCOS1/L1210 細胞には、コントロールとしての pCHO1/COS7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図 14. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、コントロールとしての pCOS1/L1210 細胞には、MABL2-scFv/COS7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

25 図 15. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、hIAP/L1210 細胞には、コントロールとしての pCHO1/COS7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図 16. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、hIAP/L1210 細胞に対し、MABL2-scFv/COS7 細胞培養上清抗体が

特異的にアポトーシスを誘起することを示す。

図 17. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞には、コントロールとしての pCHO1/COS7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 50%）。

- 5 図 18. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞に対し、MABL2-scFv/COS7 細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 50%）。

- 10 図 19. 実施例 5. 9 の CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv の精製過程において、Blue-sepharose カラムで得られた画分をハイドロキシアパタイトカラムを用いて精製した際のクロマトグラムを示す図であり、主要なピークとして画分 A、画分 B が得られたことを示す。

- 15 図 20. 実施例 5. 9 の (2) で得られた画分 A、画分 B についてゲル濾過により精製した結果を示す図であり、画分 A では見かけ上の分子量約 36 kD、画分 B では同 76 kD の位置に主要ピークが（それぞれ A I 及び B I）が溶出したことを示す。

図 21. 実施例 5. 9 の CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv の精製過程において得られた画分を SDS-PAGE で分析した図であり、何れも分子量約 35 kD に単一のバンドのみであることを示す。

- 20 図 22. CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv の精製において得られた画分 A I 及び B I をゲル濾過により分析した結果を示す図であり、画分 A I はモノマーからなり、画分 B I はダイマーからなることを示す。

図 23. 本発明の一本鎖 Fv をコードする DNA を、大腸菌の菌体内にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

- 25 図 24. 実施例 5. 12 の大腸菌細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv ポリペプチドの精製において、得られた粗製物をゲル濾過カラムを用いて精製した結果を示す図であり、各ピークはそれぞれ大腸菌細胞産生の一本鎖 Fv のモノマー、ダイマーを示す。

図 25. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A

P/L 1 2 1 0細胞には、コントロールとしてのマウスIgG抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図26．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞に対し、CHO細胞産生のMABL 2-s c Fvダイマーが
5 顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図27．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞に対し、大腸菌細胞産生のMABL 2-s c Fvダイマーが
顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図28．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞には、CHO細胞産生のMABL 2-s c Fvモノマーのア
10 ポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図29．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞には、大腸菌細胞産生のMABL 2-s c Fvモノマーのア
15 ポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図30．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞には、コントロールとしてのマウスIgG抗体は抗FLAG
抗体の添加によってもアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 $3\mu\text{g}/$
20 ml ）。

図31．実施例5．13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIAP/L 1 2 1 0細胞に対し、CHO細胞産生のMABL 2-s c Fvモノマーが
抗FLAG抗体の添加によって顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終
濃度 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図32．ヒト骨髓腫細胞株K PMM2を移植したマウスの血清中のヒトIgG量を
25 を定量したものであり、マウスにおけるヒト骨髓腫により産生されるヒトIgG
の量を測定した結果を示す図であり、s c Fv/CHOダイマーがK PMM2細胞
の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図 3 3. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、 $s c F v / C H O$ ダイマー投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図 3 4. M A B L-2 抗体由来の 2 つの H 鎖 V 領域及び 2 つの L 鎖 V 領域を含む改変抗体 $[s c (F v)_2]$ を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

5 図 3 5. [H 鎖] - [L 鎖] となるように V 領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない $s c F v$ (H L タイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 3 6. H L タイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

10 図 3 7. [L 鎖] - [H 鎖] となるように V 領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない $s c F v$ (L H タイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 3 8. L H タイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

15 図 3 9. 実施例 6. 4 におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図であり、2 つの H 鎖 V 領域及び 2 つの L 鎖 V 領域を含む改変抗体 $s c (F v)_2$ 及び種々の長さのペプチドリンカーを有する M A B L-2 抗体 $s c F v$ が発現していることを示す。

20 図 4 0 a 及び b. 実施例 6. 3 (1) にて調製した C O S 7 細胞培養上清を用いたフローサイトメトリーの結果を示す図であり、種々の長さのペプチドリンカーを有する M A B L 2 - $s c F v$ 及び $s c (F v)_2$ は、ヒト I A P に対して高い親和性を有することを示す。

図 4 1. 実施例 6. 6 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、 $s c F v < H L 3, 4, 6, 7, L H 3, 4, 6, 7 >$ 及び $s c (F v)_2$ は h I A P / L 1 2 1 0 細胞に対して顕著な細胞死を誘導することを示す。

25 図 4 2. 実施例 6. 1 0 の抗原結合評価の結果を示す図であり、 $s c F v < H L 5 >$ のダイマー及び $s c (F v)_2$ がヒト I A P に対して高い親和性を有すること示す。

図 4 3. 実施例 6. 1 1 の in vitro アポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、M A B L 2 - $s c F v < H L 5 >$ のダイマー及び M A B L 2 - $s c (F v)_2$ は h I

AP/L1210、CCRF-CEMの両細胞に対して濃度依存的に細胞死を誘導することを示す。

図44. ヒト骨髓腫細胞株KPM2を移植したマウスにおけるヒト骨髓腫により産生される血清中のMタンパク質の量を測定した結果を示す図であり、scFv<HL-5>及びsc(Fv)₂がKPM2細胞の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図45. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、scFv<HL-5>投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図46. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、sc(Fv)₂投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図47. 15アミノ酸からなるリンカー配列を含む再構成12B5一本鎖FvをコードするDNA断片の構築方法とその構造を概略的に示す。

図48. 実施例7. 5 (1) で得られた各12B5一本鎖Fvを、ゲル濾過により精製した結果を示す図であり、sc12B5では2つのピーク (画分A, B) に分かれた結果を示す。

図49. 実施例7. 5 (2) において、各画分AおよびBをSDS-PAGEにより分析した結果を示す。

図50. 実施例7. 5 (2) において、各画分AおよびBをSuperdex 200カラムにより分析した結果を示し、(a) 画分Aでは見かけ上の分子量約44 kDに、(b) 画分Bでは同22 kDの位置に主要ピークが溶出されたことを示す。

図51. sc12B5及び12B5抗体 (IgG, Fab) のTPO様アゴニスト活性の測定結果を示し、12B5 IgG及び一価一本鎖Fv (sc12B5) は、濃度依存的にTPO様のアゴニスト活性を有することを示す。

図52. sc12B5モノマー及びダイマーのTPO様アゴニスト活性の測定結果を示し、二価の抗原結合部位を持つ一本鎖Fv (sc12B5ダイマー) は一価のsc12B5より約400倍以上強いアゴニスト活性を示し、その強さはヒトTPOと同等もしくはそれ以上であることを示す。

産業上の利用可能性

本発明の改変抗体は、細胞表面上の分子を架橋することにより該細胞内にシグナルを伝達しうるアゴニスト作用を有しており、また抗体分子（whole IgG）と比較して低分子化が達成されているため、組織、腫瘍への移行性に優れているという特徴を有している。さらに本発明の改変抗体は、元のモノクローナル抗体と比較して顕著に高い活性を有しているが、これは本発明の改変抗体が抗体分子に比べてよりリガンドに近い形態であるためと考えられる。従って、当該改変抗体はシグナル伝達アゴニストとして使用することができ、そして抗体分子を本発明の改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して所望の作用のみを誘起しうる新規な医薬品を提供される。本発明の改変抗体を有効成分とする医薬製剤は、癌、炎症、ホルモン異常、並びに白血病、悪性リンパ腫、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群および真性多血症などの血液疾患の予防及び／又は治療薬として有用である。

請求の範囲

1. 細胞表面分子を架橋することによりアゴニスト作用を示す、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体。
2. H鎖V領域及びL鎖V領域がリンカーを介して連結されている、請求項1記載の改変抗体。
3. リンカーが、少なくとも1個以上のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、請求項1または2記載の改変抗体。
4. 改変抗体が、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマーから構成される請求項1～3のいずれか1項に記載の改変抗体。
5. 改変抗体が、2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである請求項1～3のいずれか1項に記載の改変抗体。
6. 改変抗体が、さらにポリペプチド精製のためのアミノ酸配列を含む請求項1～5のいずれか1項に記載の改変抗体。
7. 改変抗体が精製されたものである、請求項1～6のいずれか1項に記載の改変抗体。
8. H鎖V領域及び／又はL鎖V領域がヒト型化H鎖V領域及び／又はL鎖V領域である請求項1～7のいずれか1項に記載の改変抗体。
9. 前記細胞表面分子が、ホルモン受容体またはサイトカイン受容体である、請求項1～8のいずれか1項に記載の改変抗体。
10. 細胞表面分子が、エリスロポエチン（EPO）受容体、トロンボポエチン（TPO）受容体、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）受容体、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体、腫瘍壊死因子（TNF）受容体、インターロイキン-1（IL-1）受容体、インターロイキン-2（IL-2）受容体、インターロイキン-3（IL-3）受容体、インターロイキン-4（IL-4）受容体、インターロイキン-5（IL-5）受容体、インターロイキン-6（IL-6）受容体、インターロイキン-7（IL-7）受容体、インターロイキン-9（IL-9）受容体、インターロイキン-10（IL-10）受容体、インター

ロイキン-11 (IL-11) 受容体、インターロイキン-12 (IL-12) 受容体、インターロイキン-13 (IL-13) 受容体、インターロイキン-15 (IL-15) 受容体、インターフェロン- α (IFN- α) 受容体、インターフェロン- β (IFN- β) 受容体、インターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体、成長ホルモン (GH) 受容体、インスリン受容体、血液幹細胞増殖因子 (SCF) 受容体、血管上皮増殖因子 (VEGF) 受容体、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体、神経成長因子 (NGF) 受容体、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 受容体、白血球遊走阻止因子 (LIF) 受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、オンコスタチンM (OSM) 受容体および Notchファミリー受容体からなる群から選択される請求項9に記載の改変抗体。

11. アゴニスト作用が、アポトーシス誘導、細胞増殖誘導または細胞分化誘導である、請求項1~10のいずれか1項に記載の改変抗体。

12. L鎖V領域及びH鎖V領域が、同一のモノクローナル抗体由来である、請求項1~11のいずれか1項に記載の改変抗体。

13. 元のモノクローナル抗体と比較して改善されたアゴニスト作用を示す、請求項1~12のいずれか1項に記載の改変抗体。

14. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体をコードするDNA。

15. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体を産生する動物細胞。

16. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体を産生する微生物。

17. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体のアゴニストとしての使用。

18. 一本鎖Fvを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して、該培地中に一本鎖Fvを分泌させ、該培地中で形成された一本鎖Fvダイマーを精製することを特徴とする一本鎖Fvダイマーの製造方法。

19. 一本鎖Fvを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して、該培地中に一本鎖Fvを分泌させ、該培地中で該一本鎖Fvのダイマーを形成させることを

特徴とする、一本鎖F_vダイマーの安定化方法。

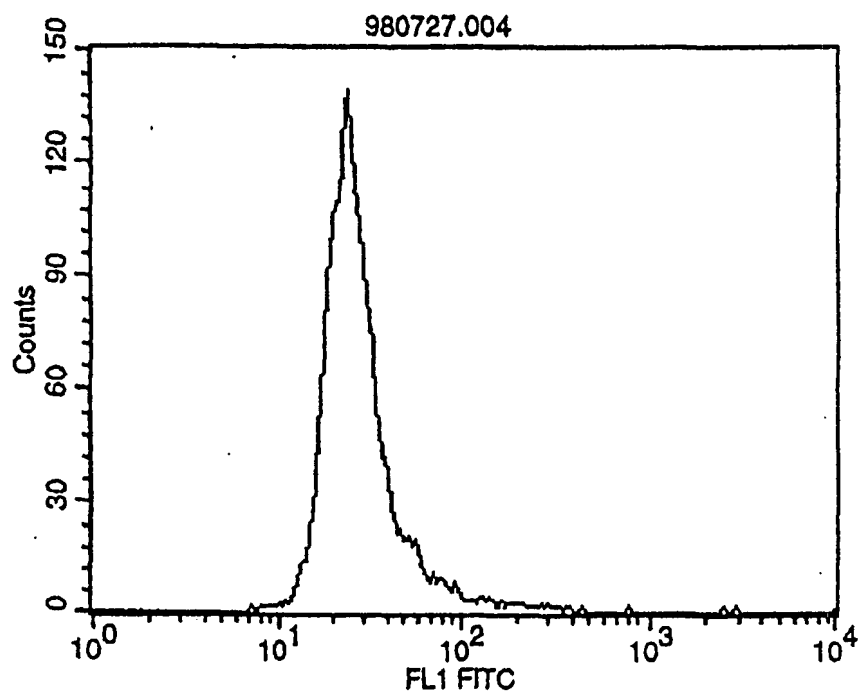
20. 細胞表面分子に結合する第1のリガンドと第2のリガンドを投与し、さらに第1及び第2のリガンドに結合して、前記第1及び第2のリガンドを架橋する物質を投与する、細胞にアゴニスト作用を誘導する方法。

- 5 21. 第1及び第2のリガンドが、同一又は異なる一本鎖F_vモノマーである請求項20記載の方法。

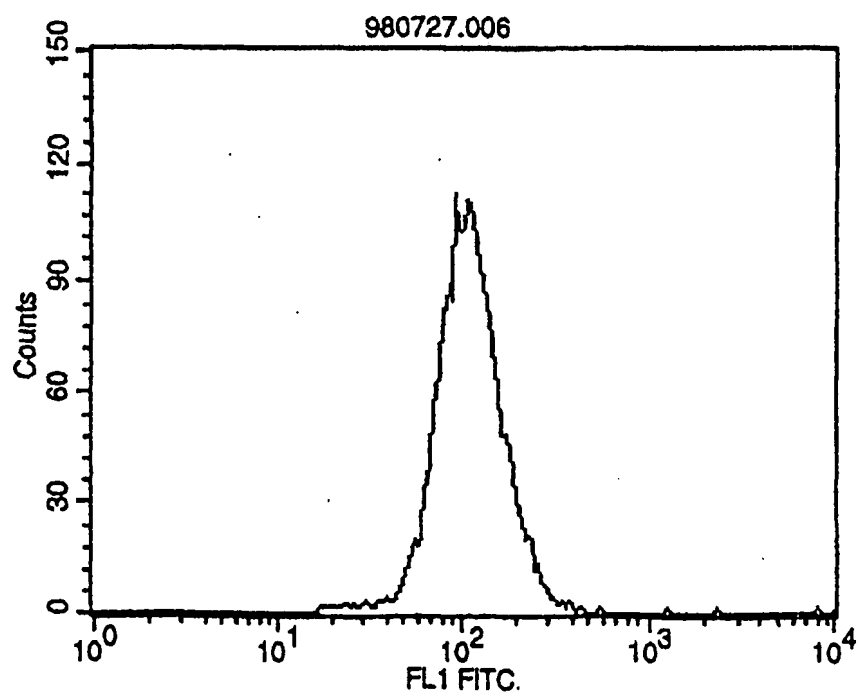
22. リガンドを架橋する物質が、抗体、抗体断片または2価の改変抗体である、請求項20又は21記載の方法。

1/43

☒ 1



☒ 2



2/43

☒ 3

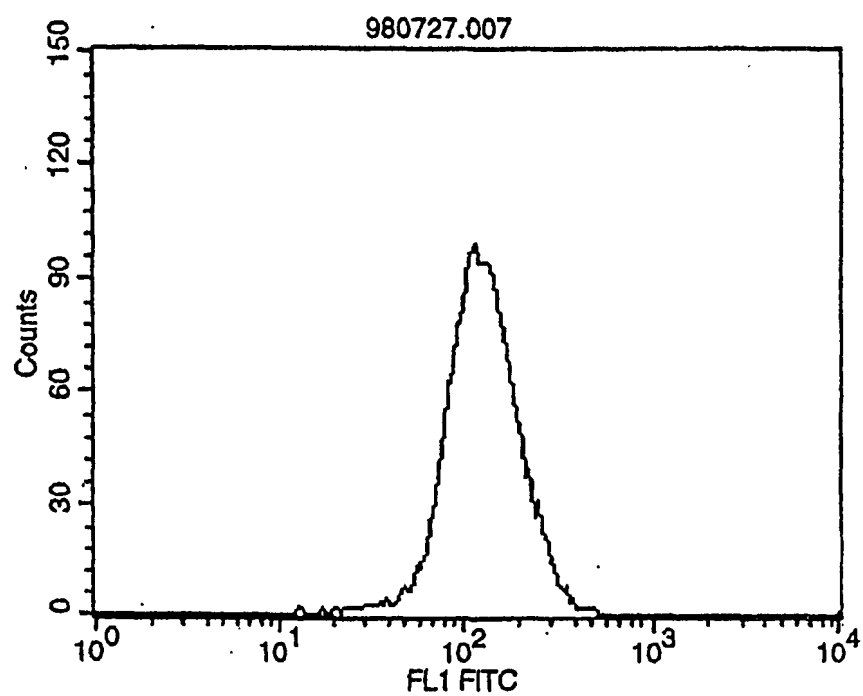


図 4

3/43

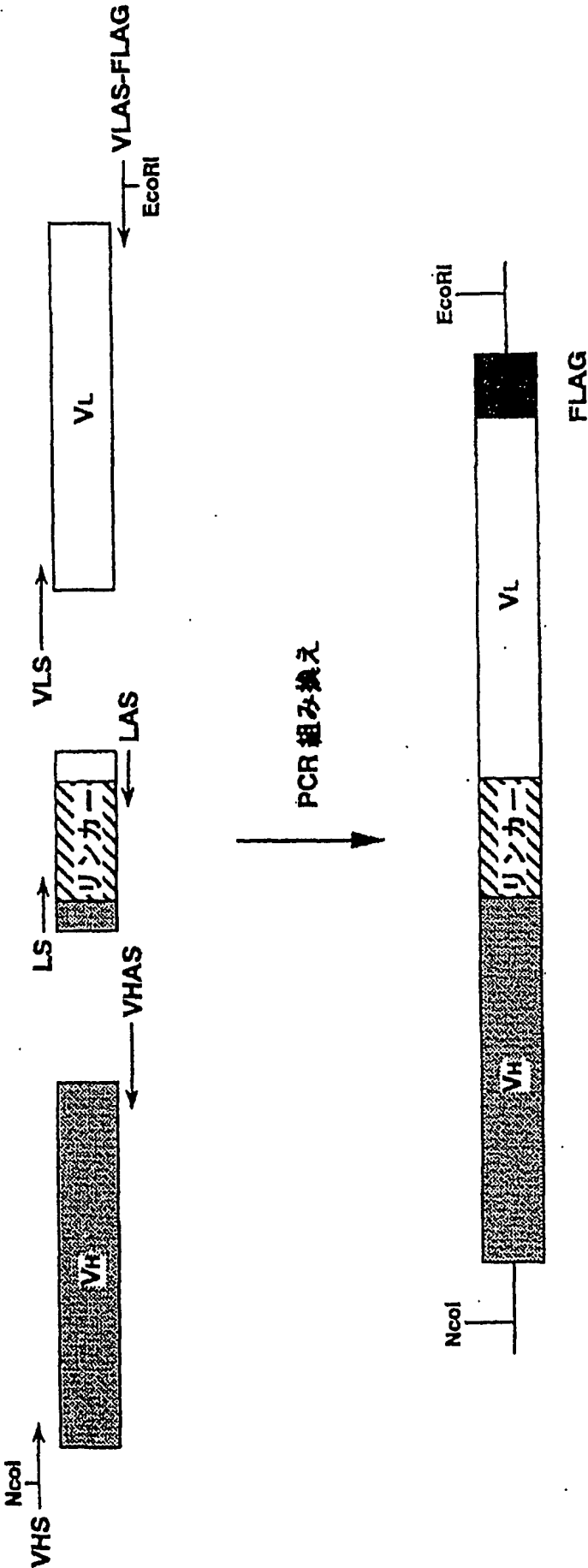


図 5

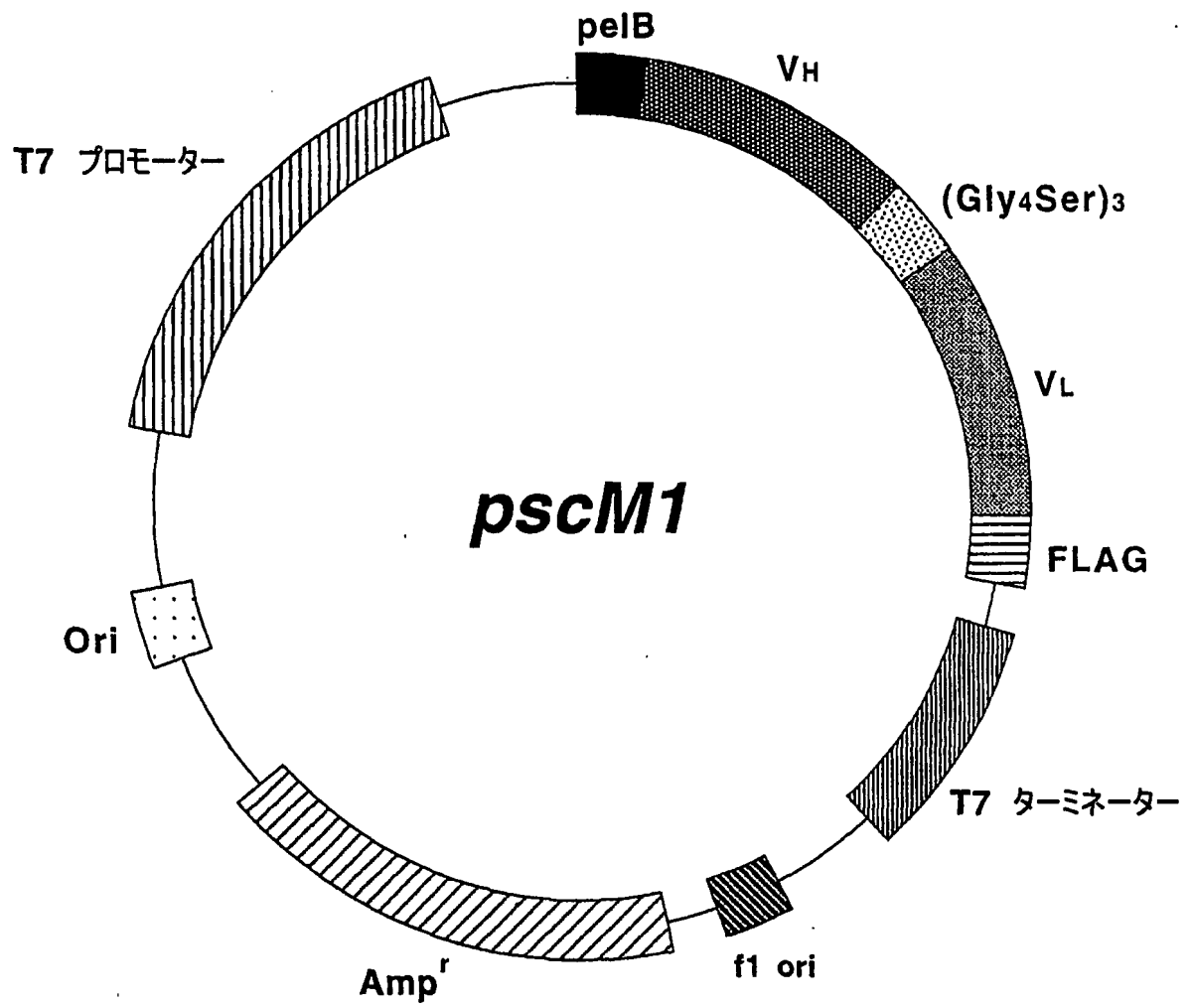
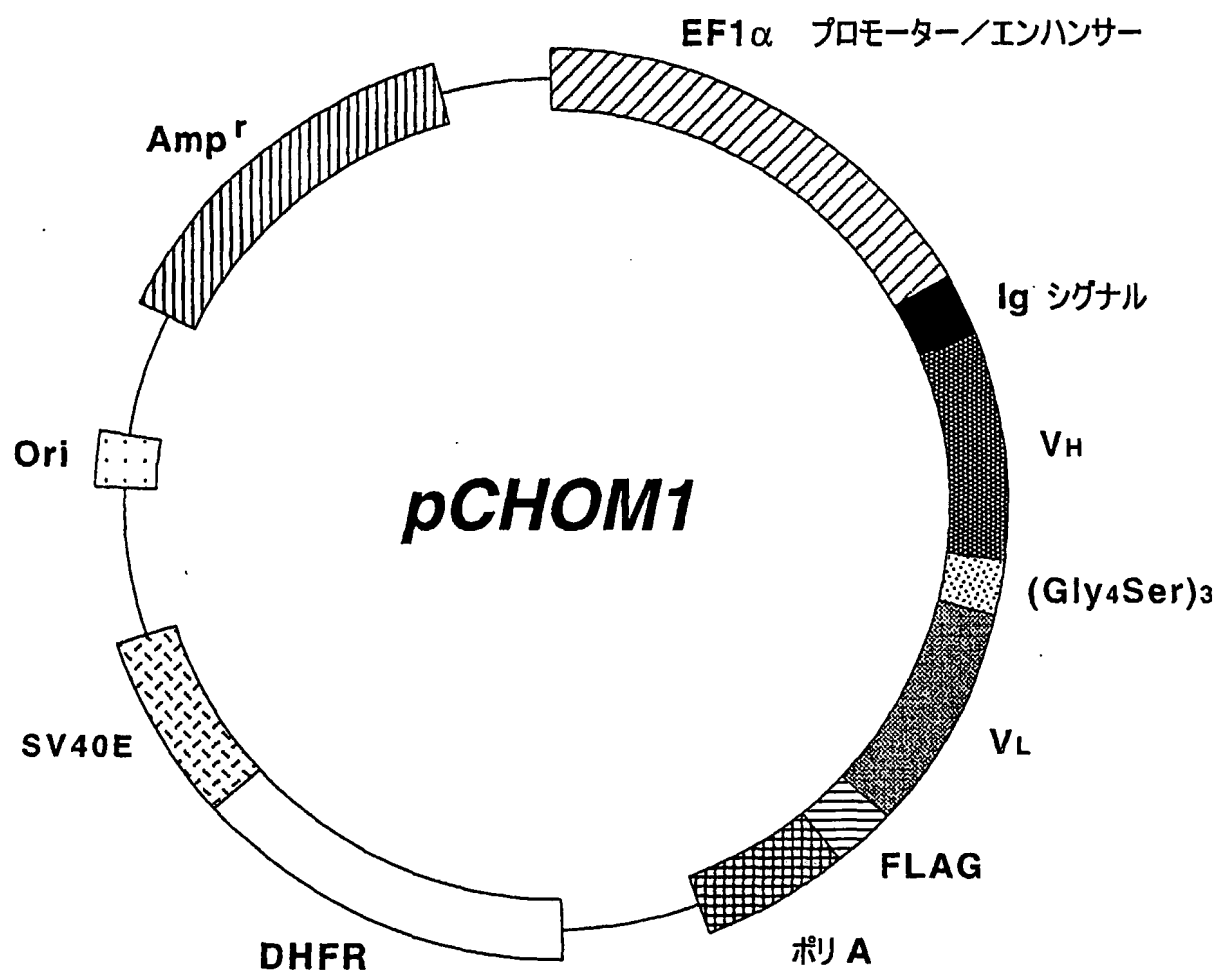
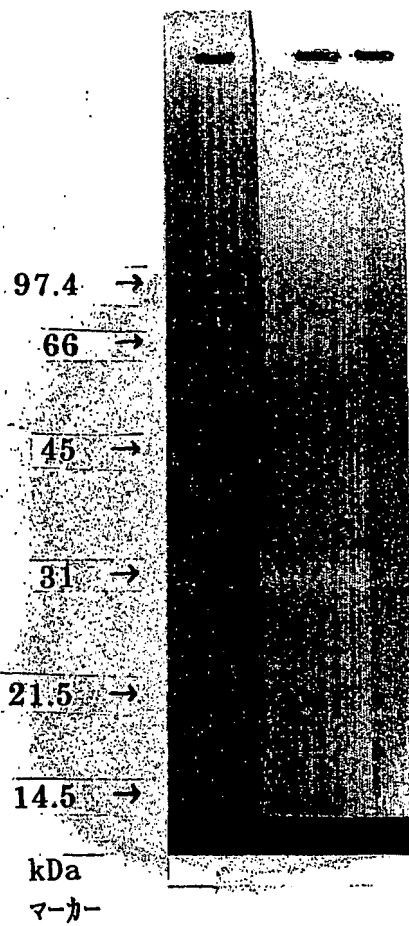


図 6



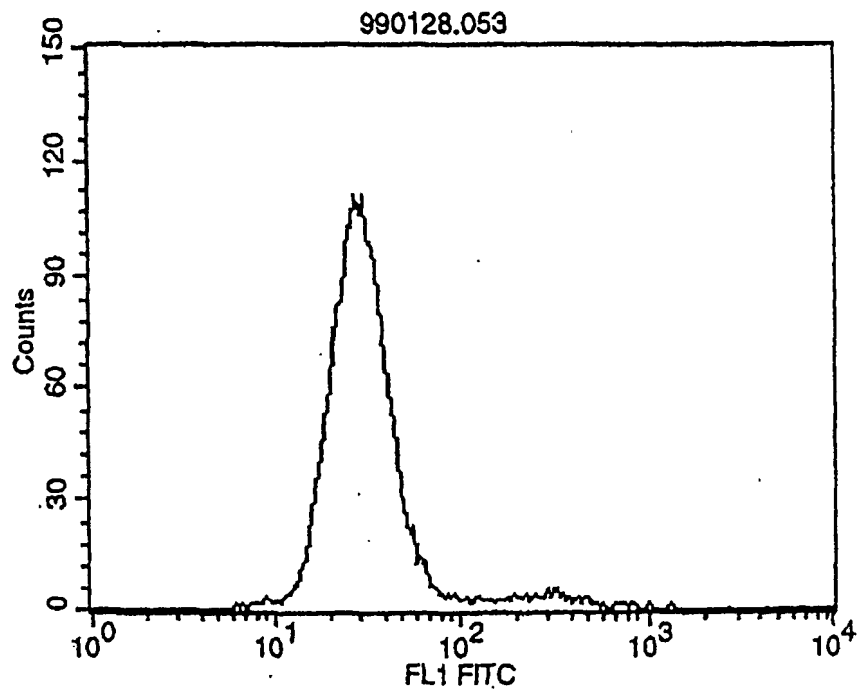
6/43

図 7

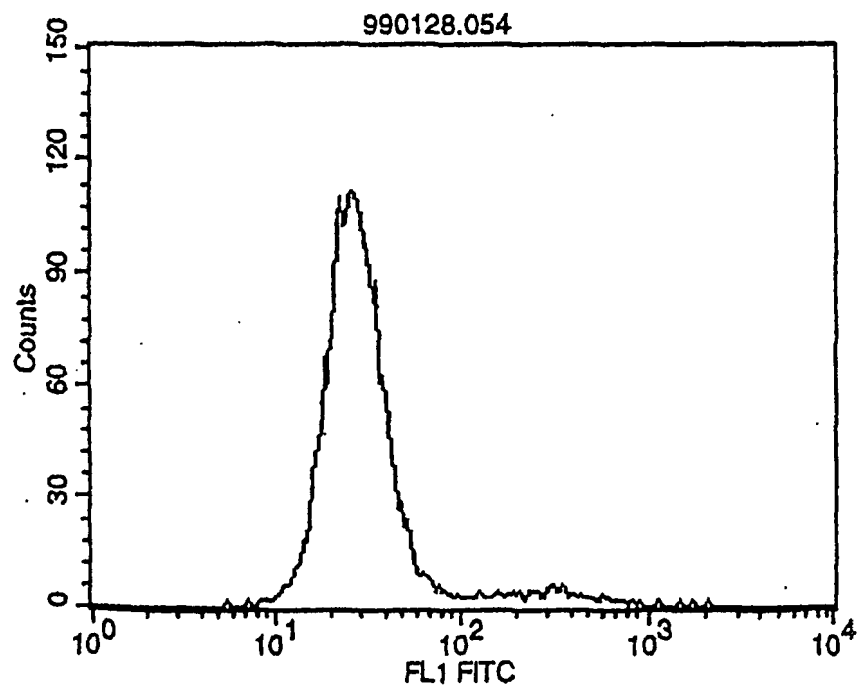


7/43

☒ 8

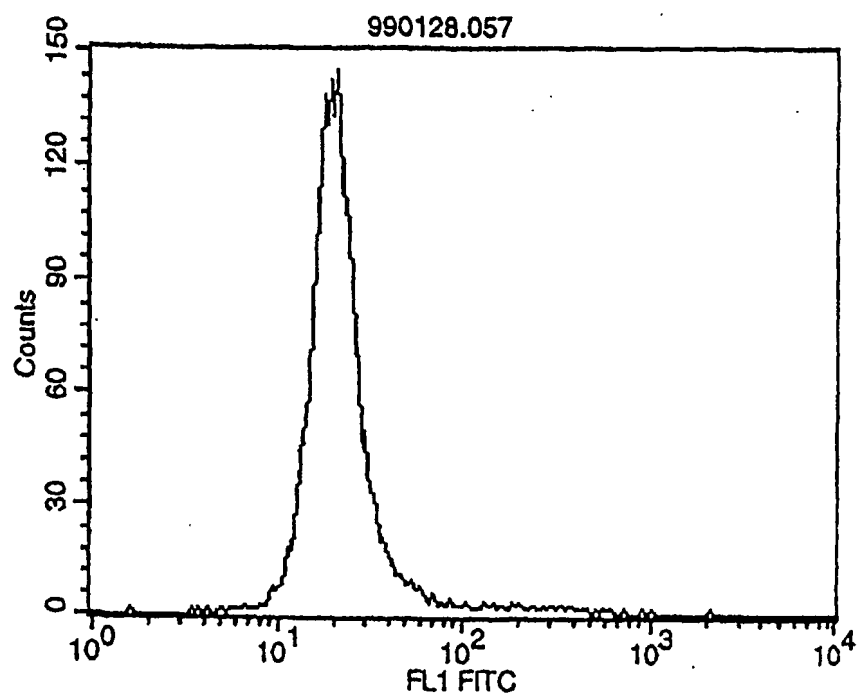


☒ 9

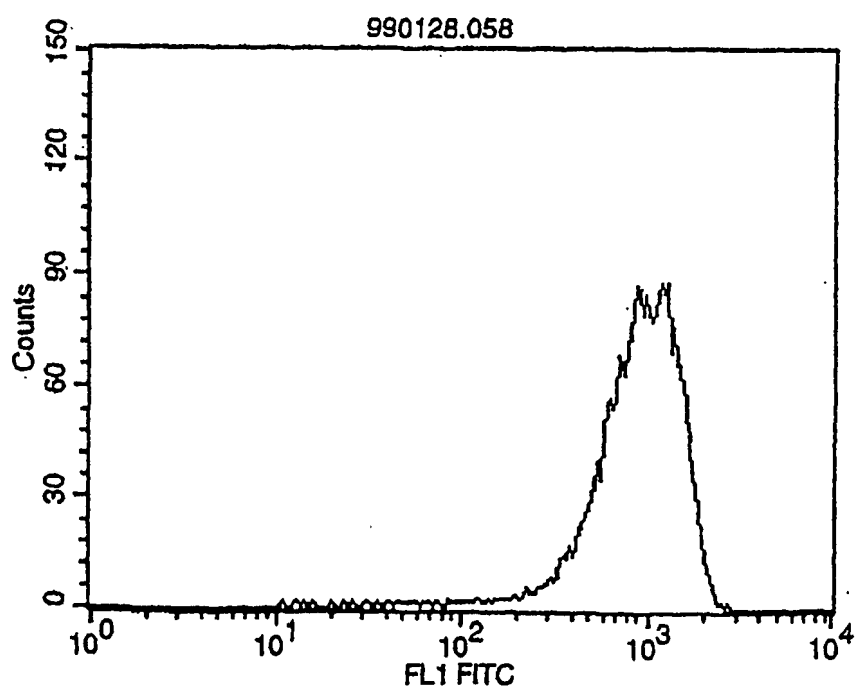


8/43

☒ 1 0



☒ 1 1



9/43

図 1 2

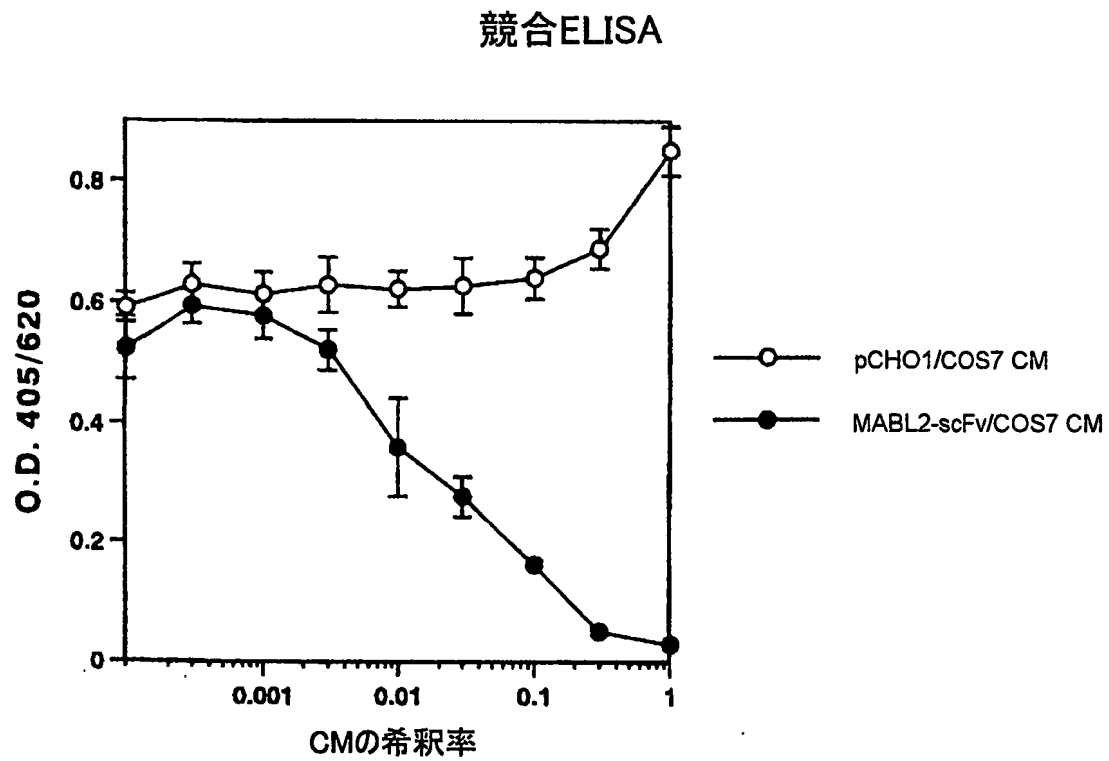
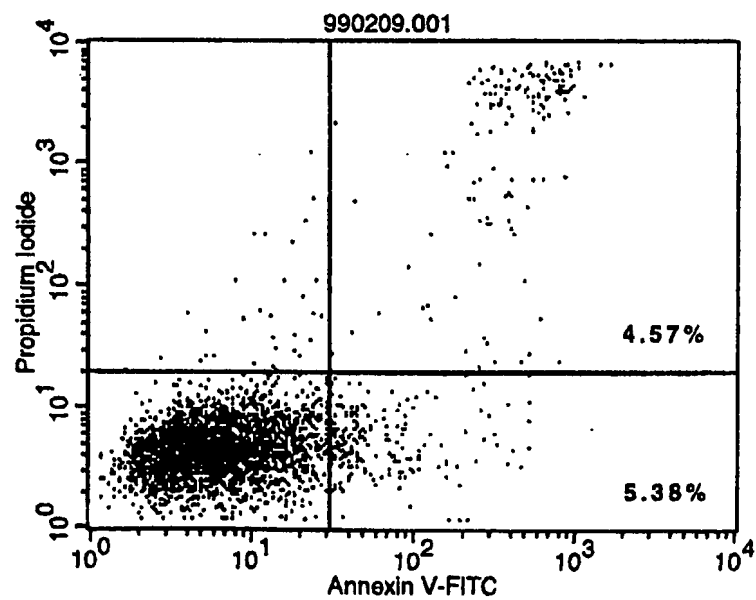


図 1 3



10/43

Figure 14

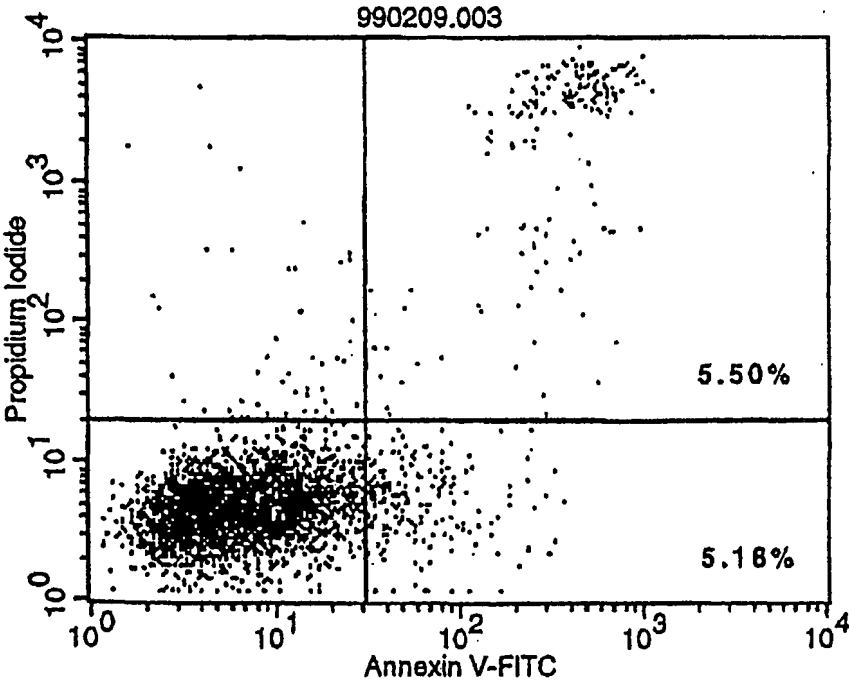
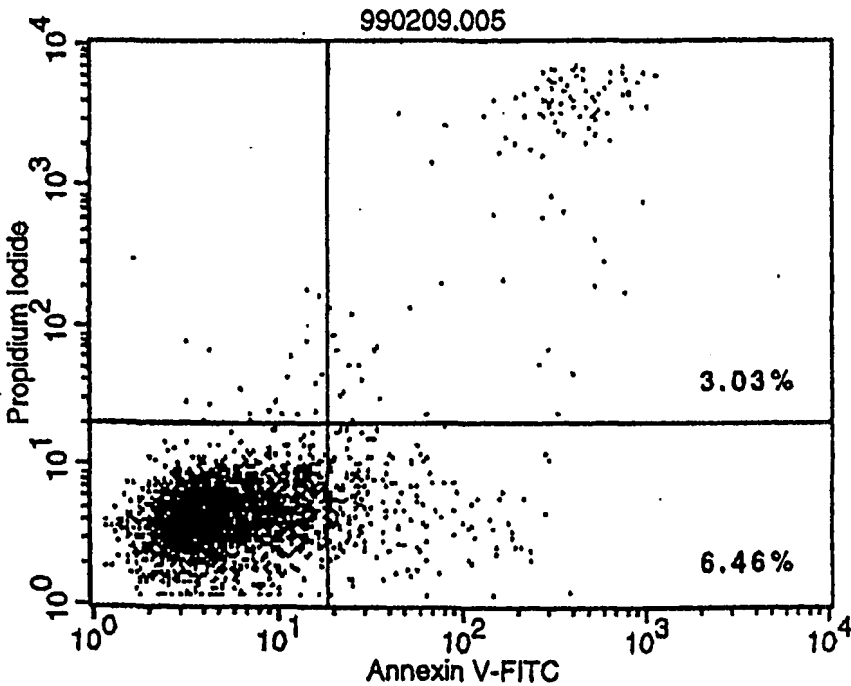


Figure 15



11/43

图 16

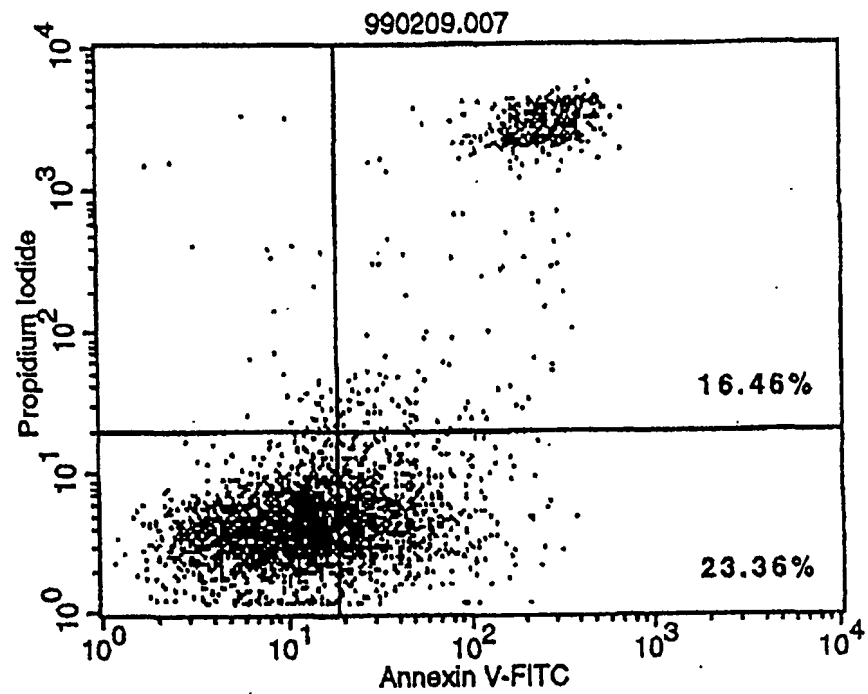


图 17

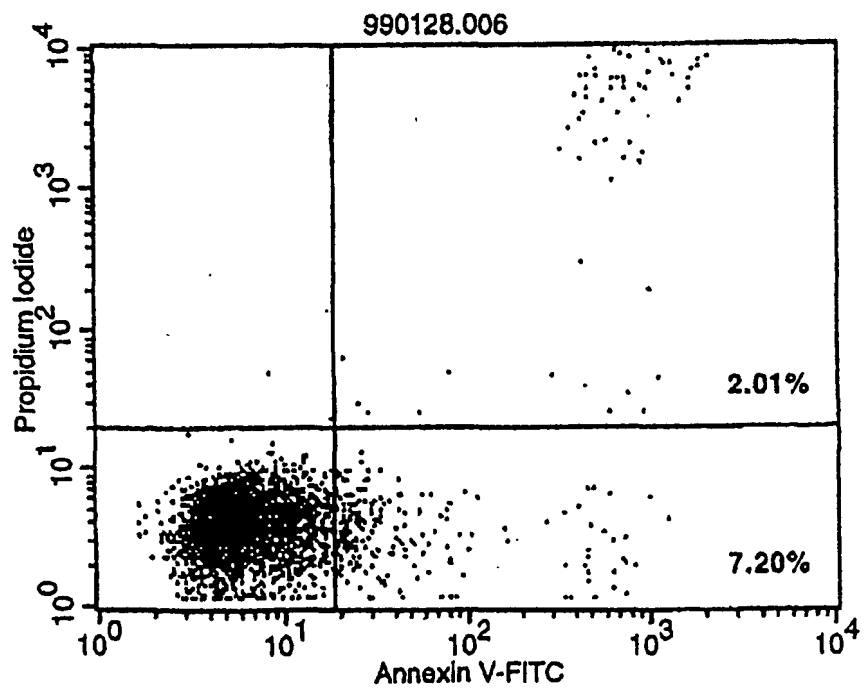


Figure 18

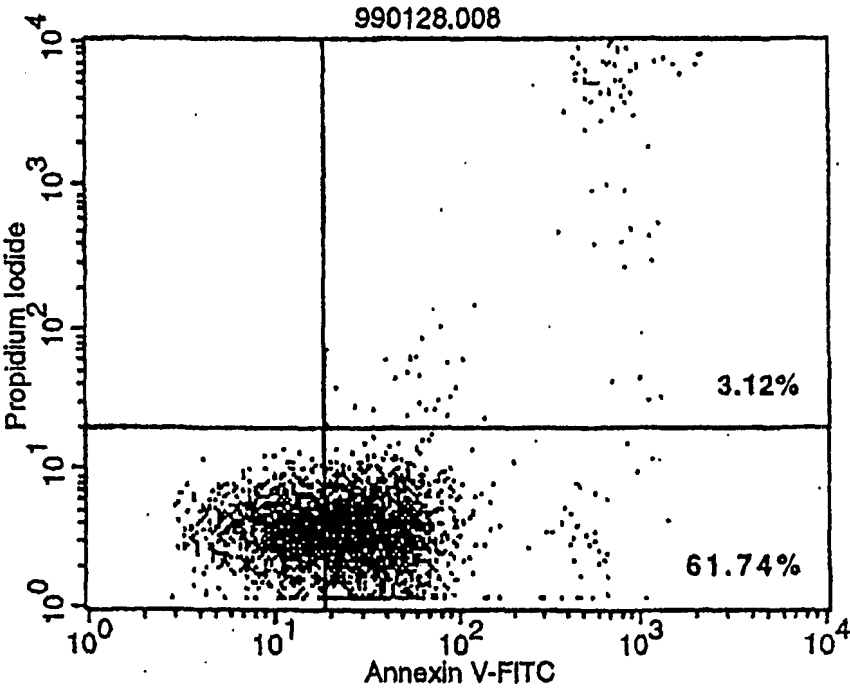
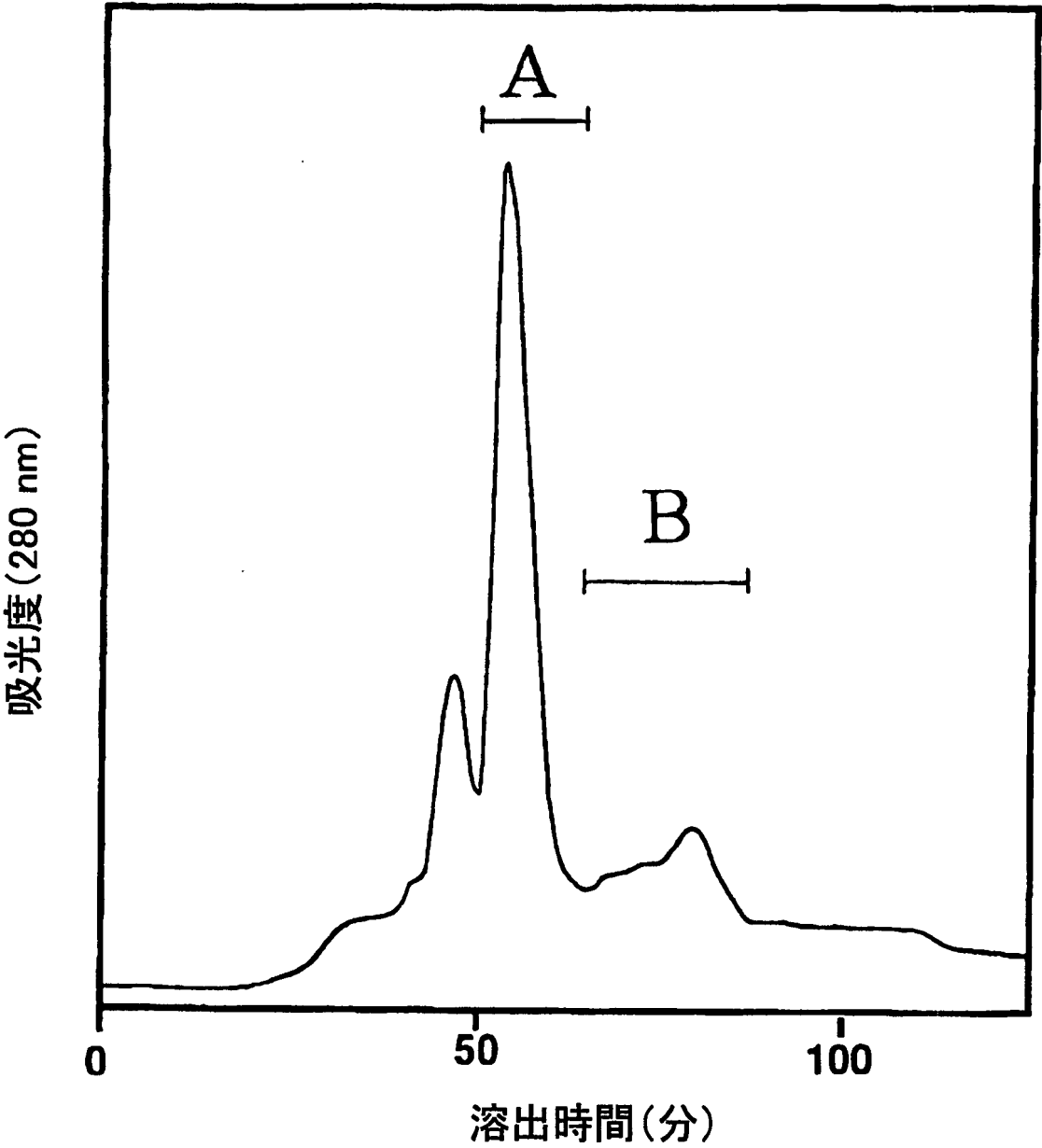


図 19



14/43

図 20

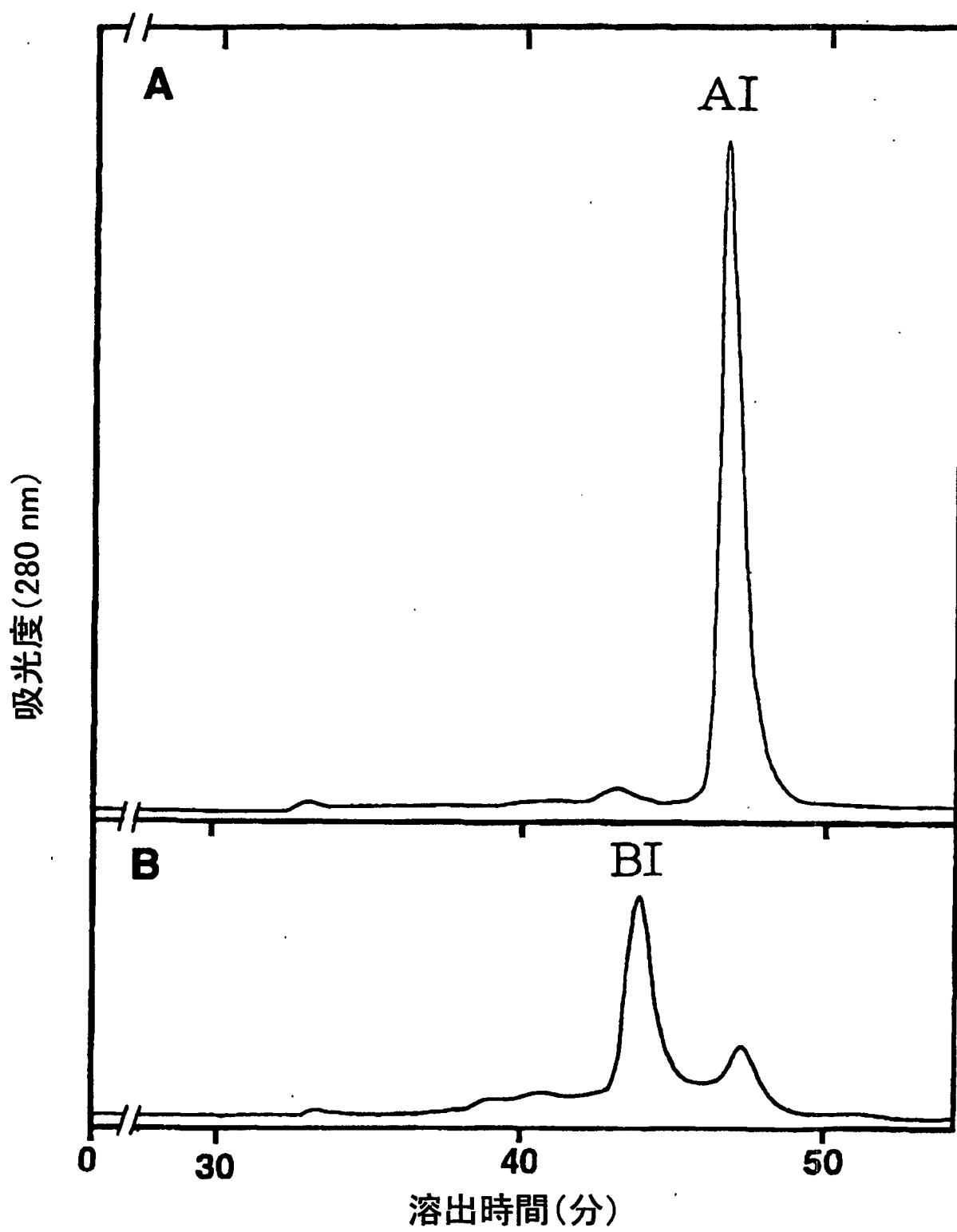
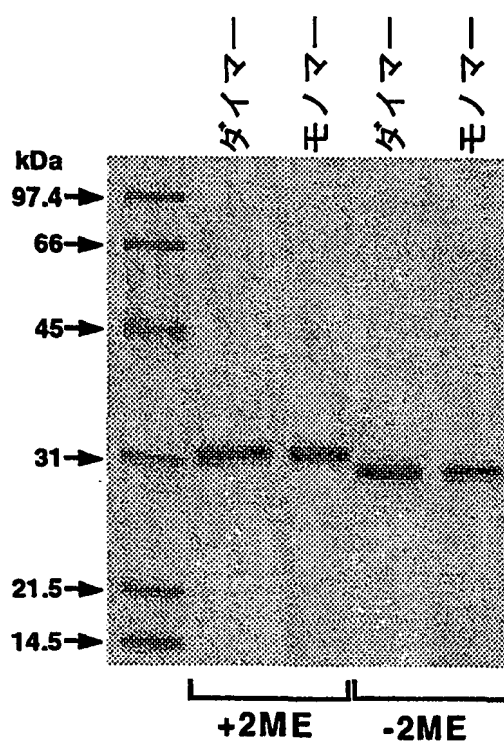


図 2 1

MABL2-scFvのSDS-PAGE分析

<CHO>



<E. coli>

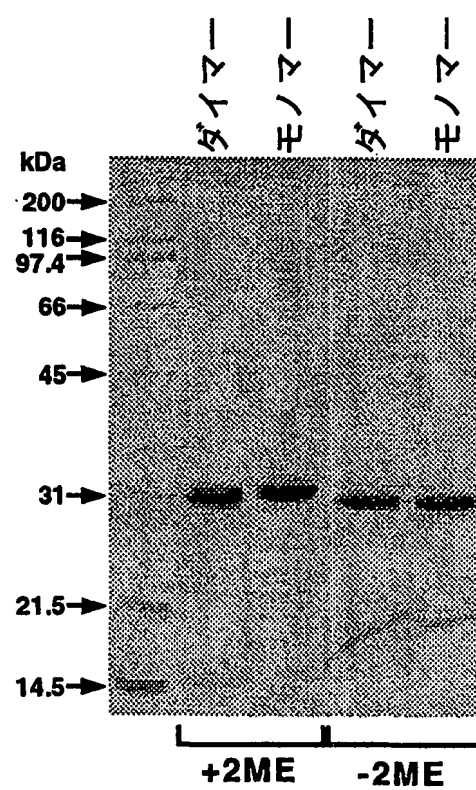


図 2 2

16/43

TSK gel G3000SW

20 mM 酢酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 6.0

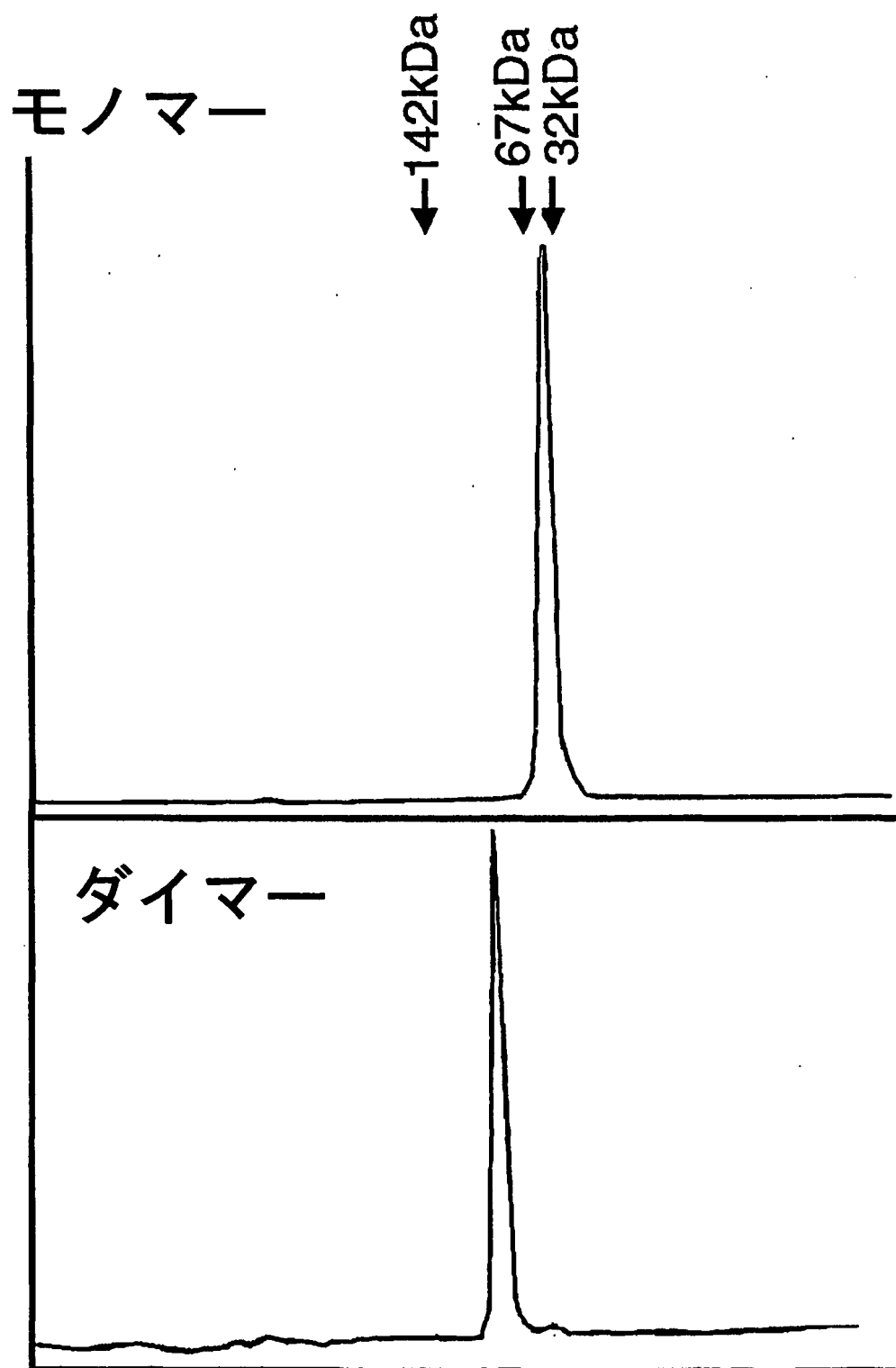


図 2 3

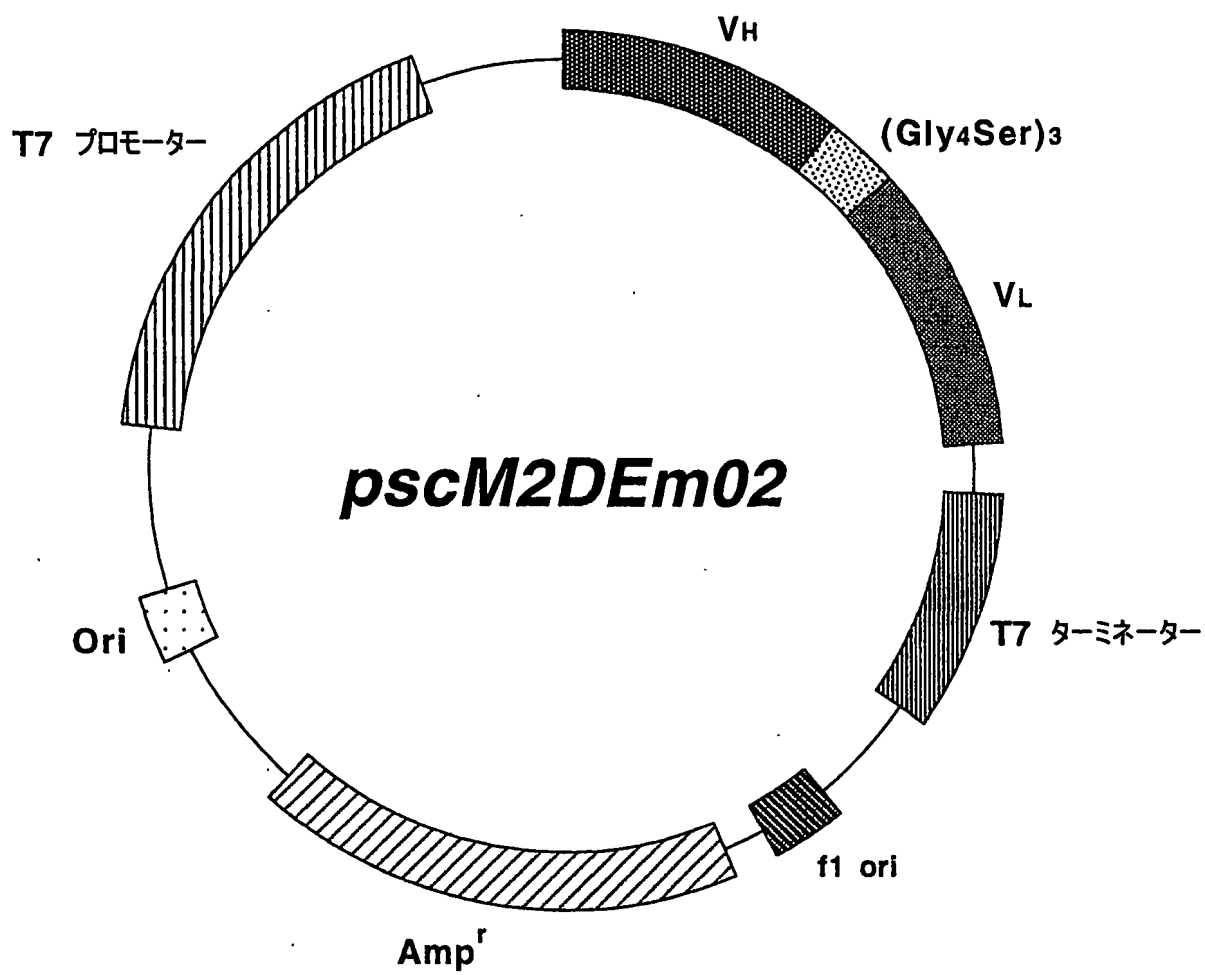
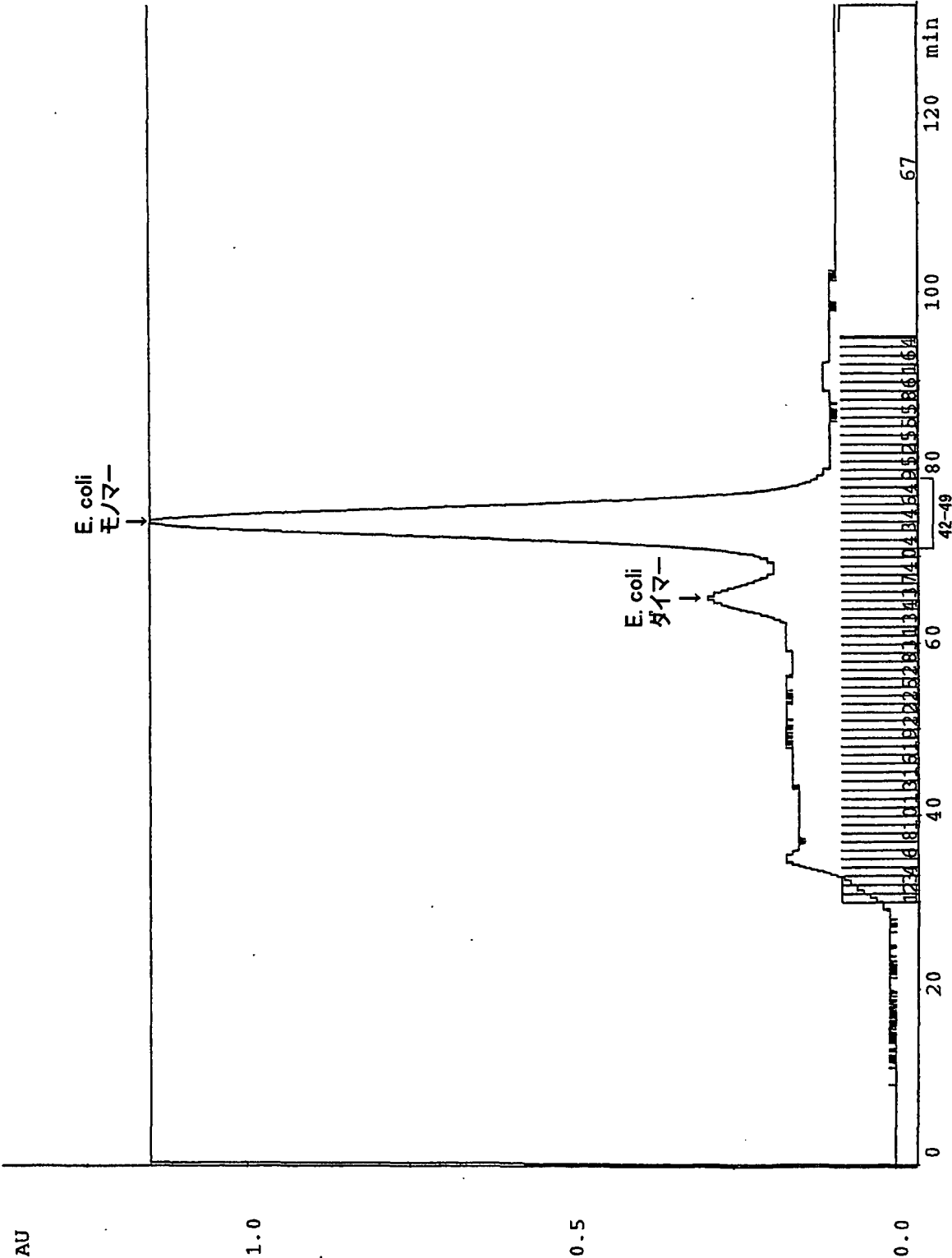
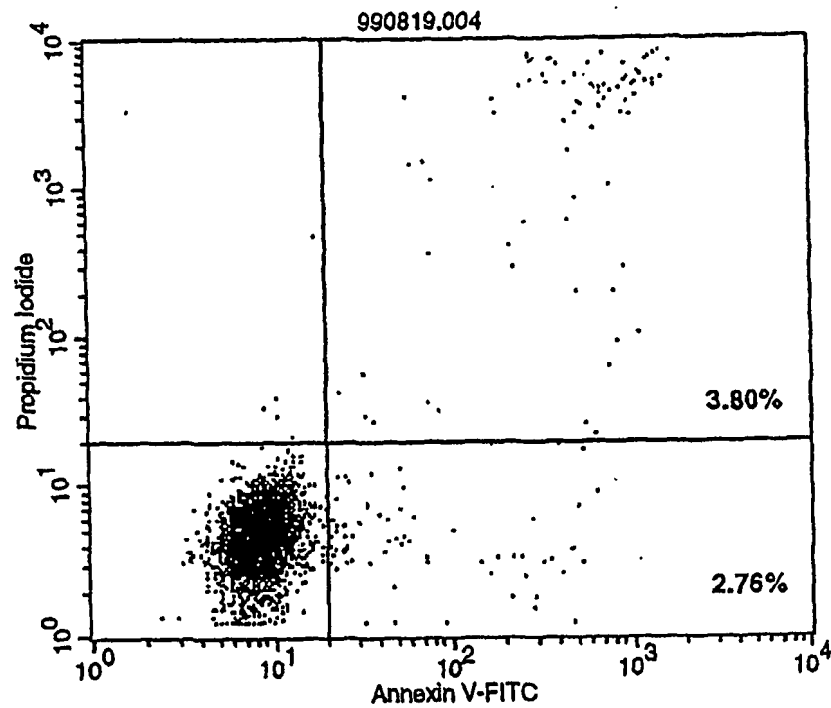


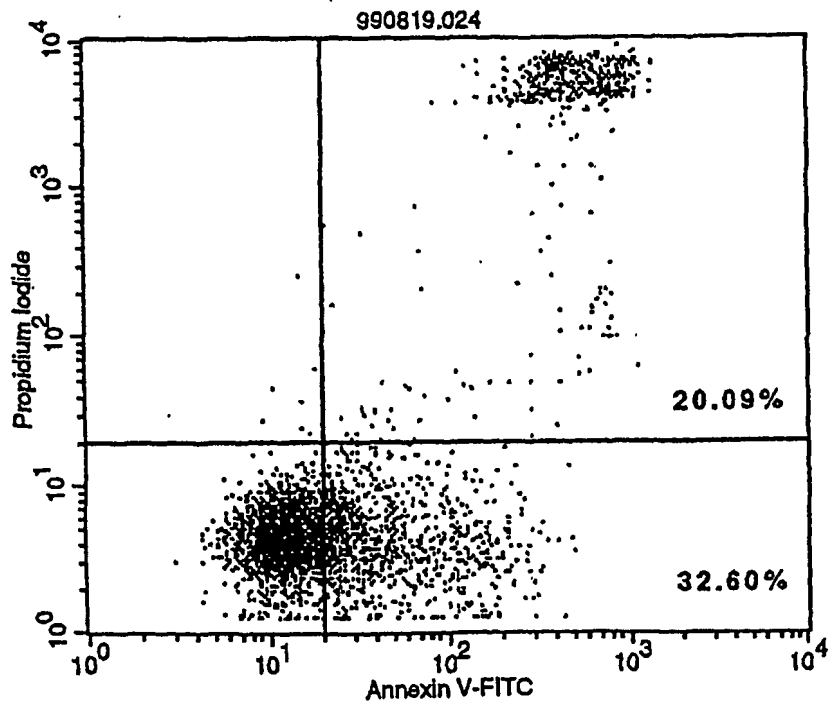
図 2 4



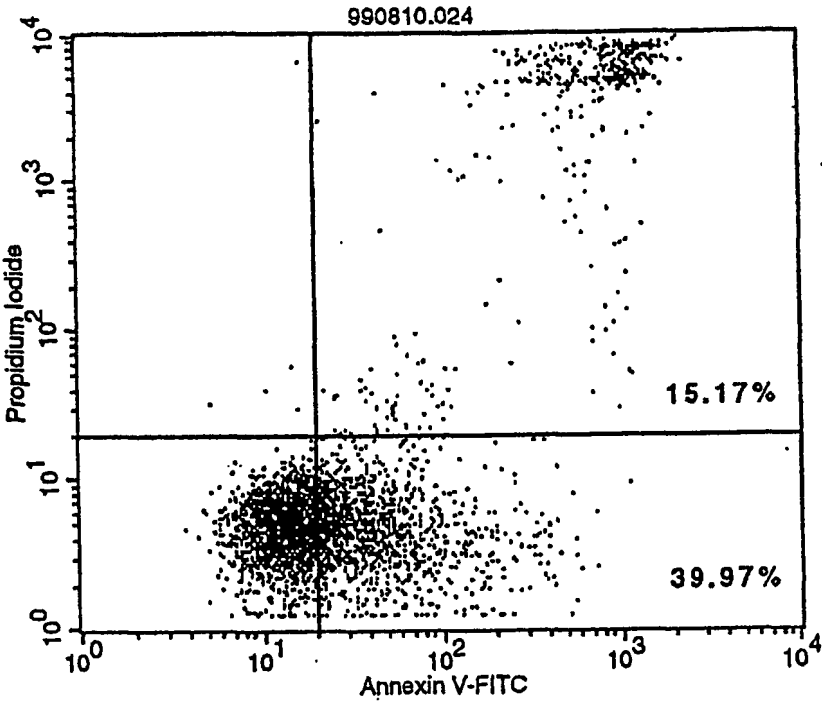
25



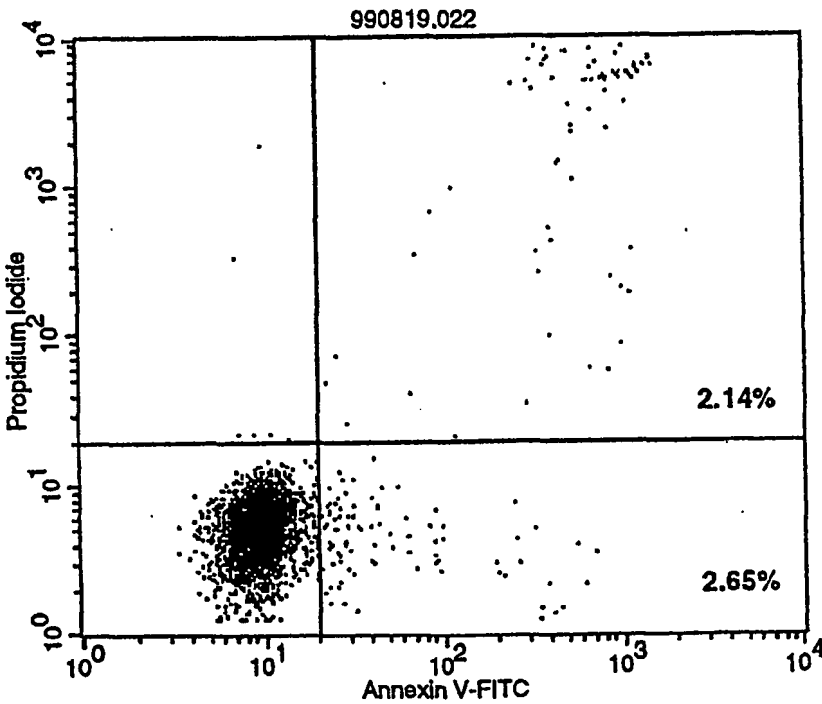
26



27

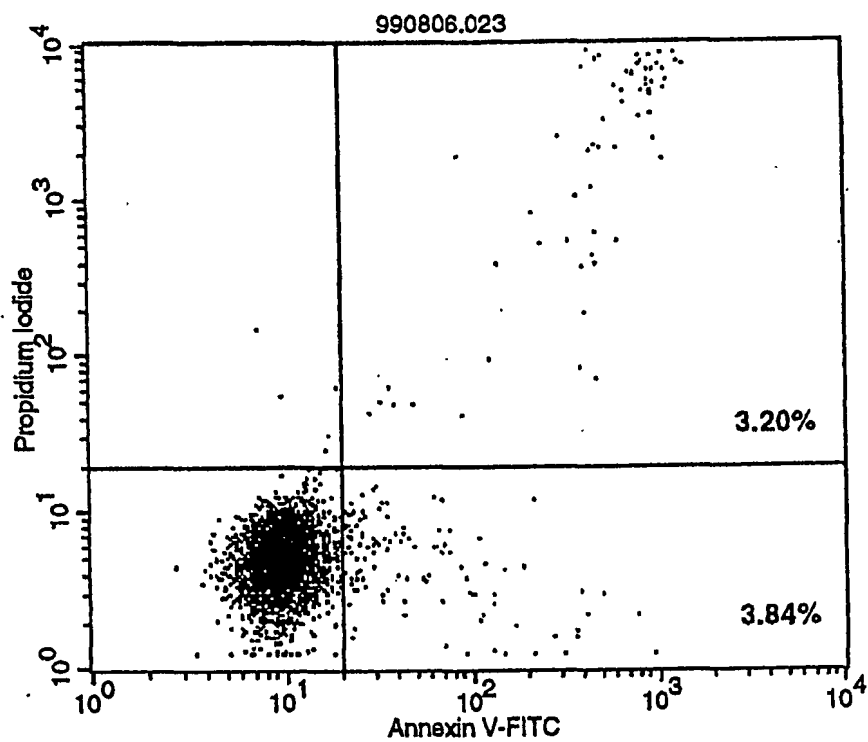


28



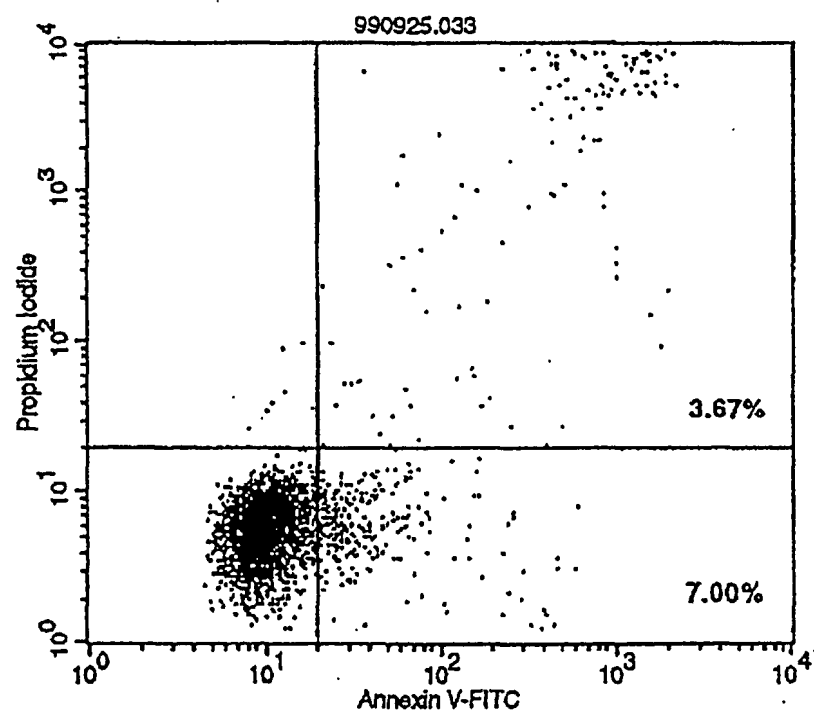
21/43

图 29

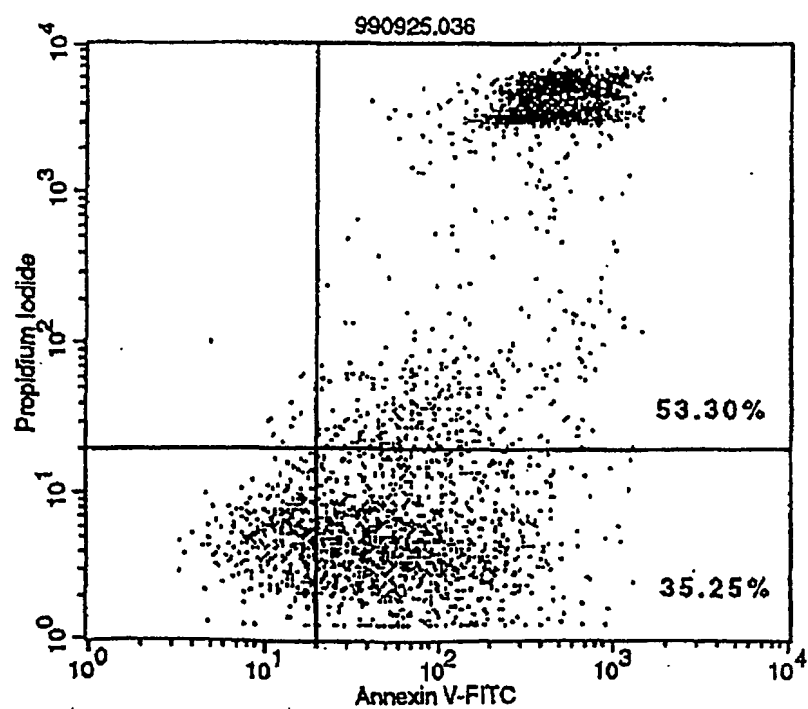


22/43

30



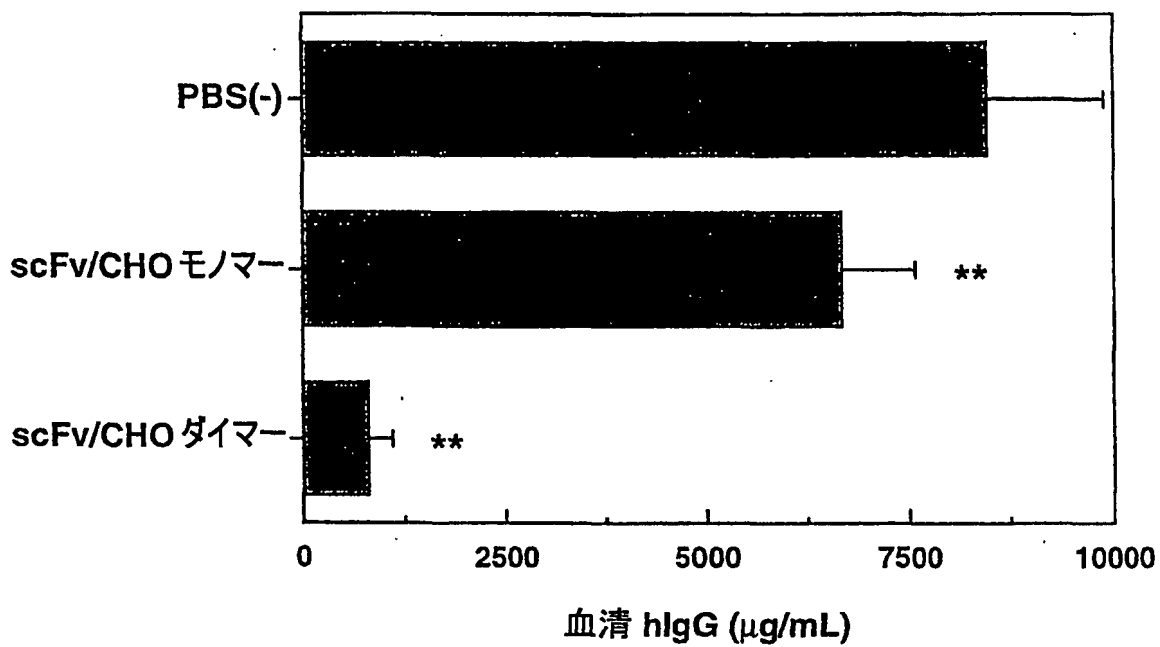
31



23/43

図 3 2

KPMM2 i.v. SCIDマウス中の
血清hIgGにおけるMABL-2(scFv)の効果



** : $p < 0.01$

24/43

図 3 3

KPMM2 i.v. SCIDマウスの
生存におけるMABL-2(scFv)の効果

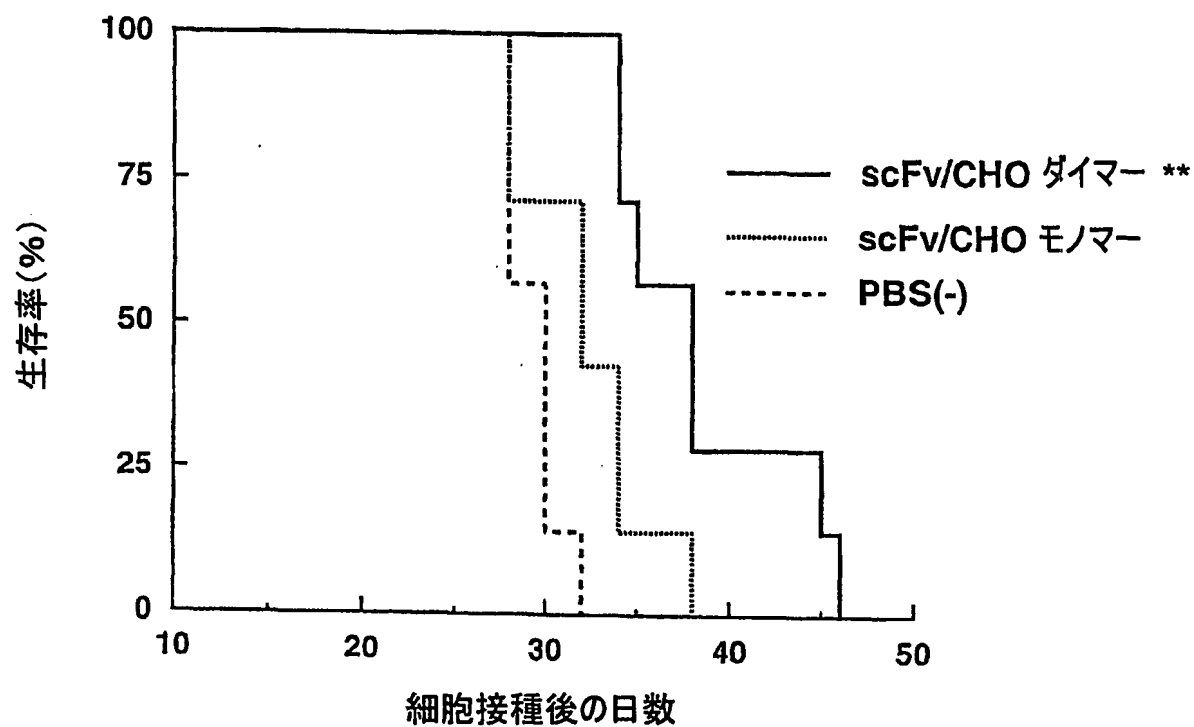
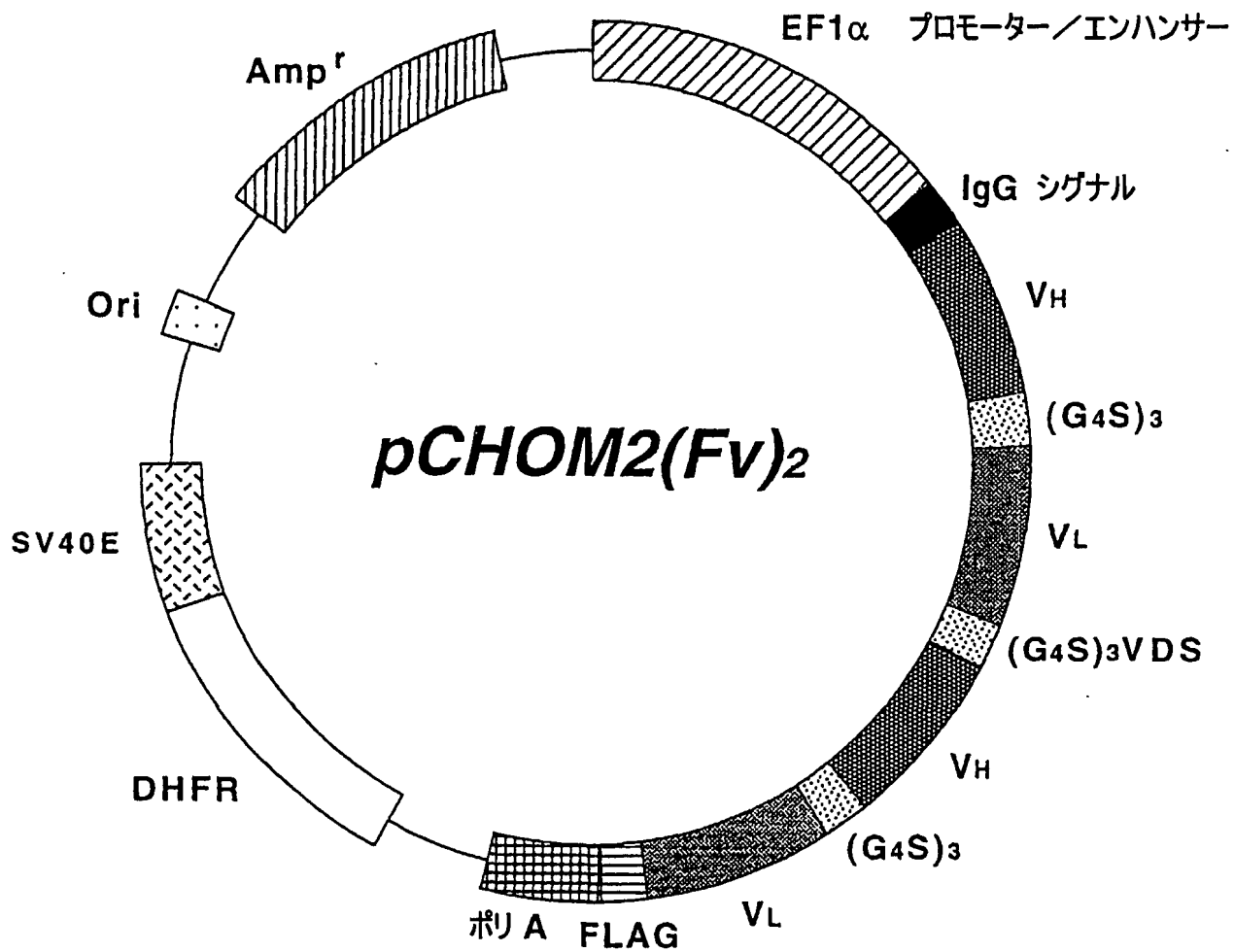
** ; t検定による, $P < 0.01$

図 3 4



26/43

図 3 5

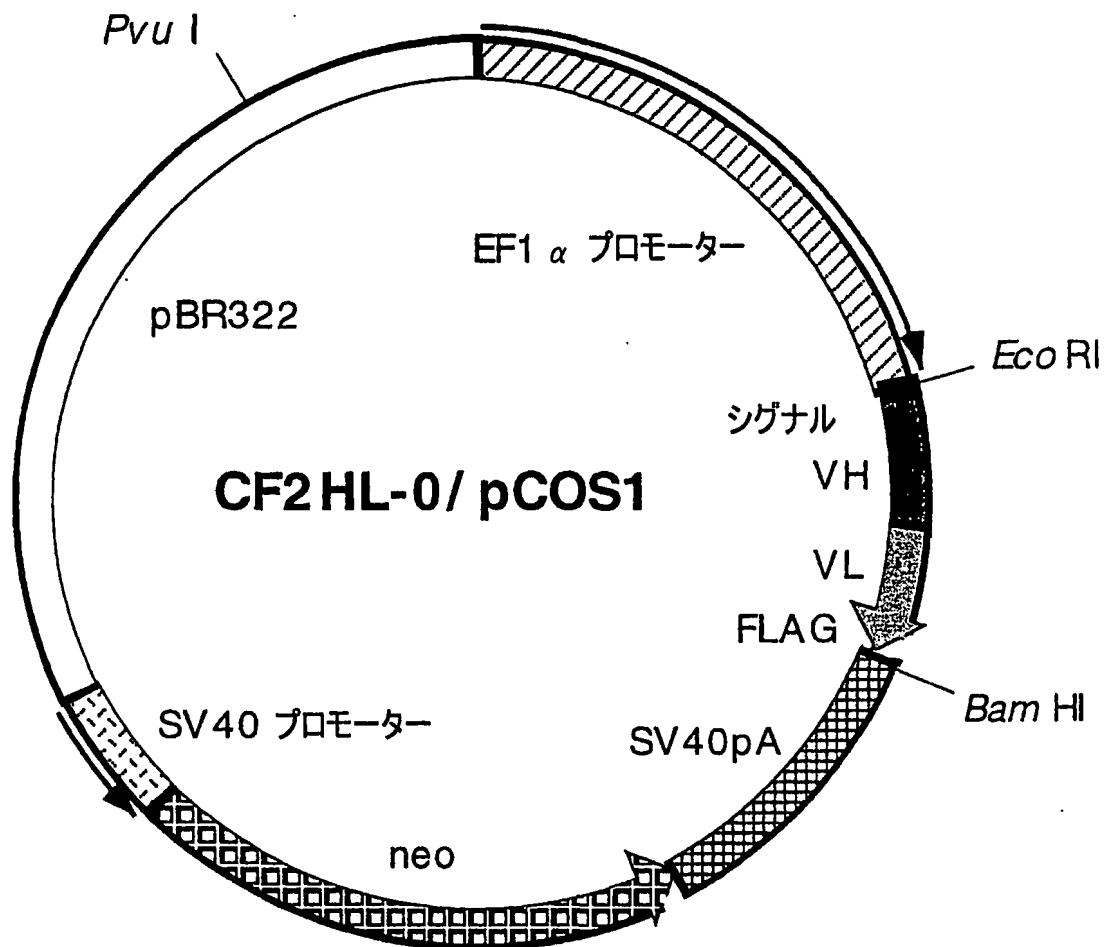


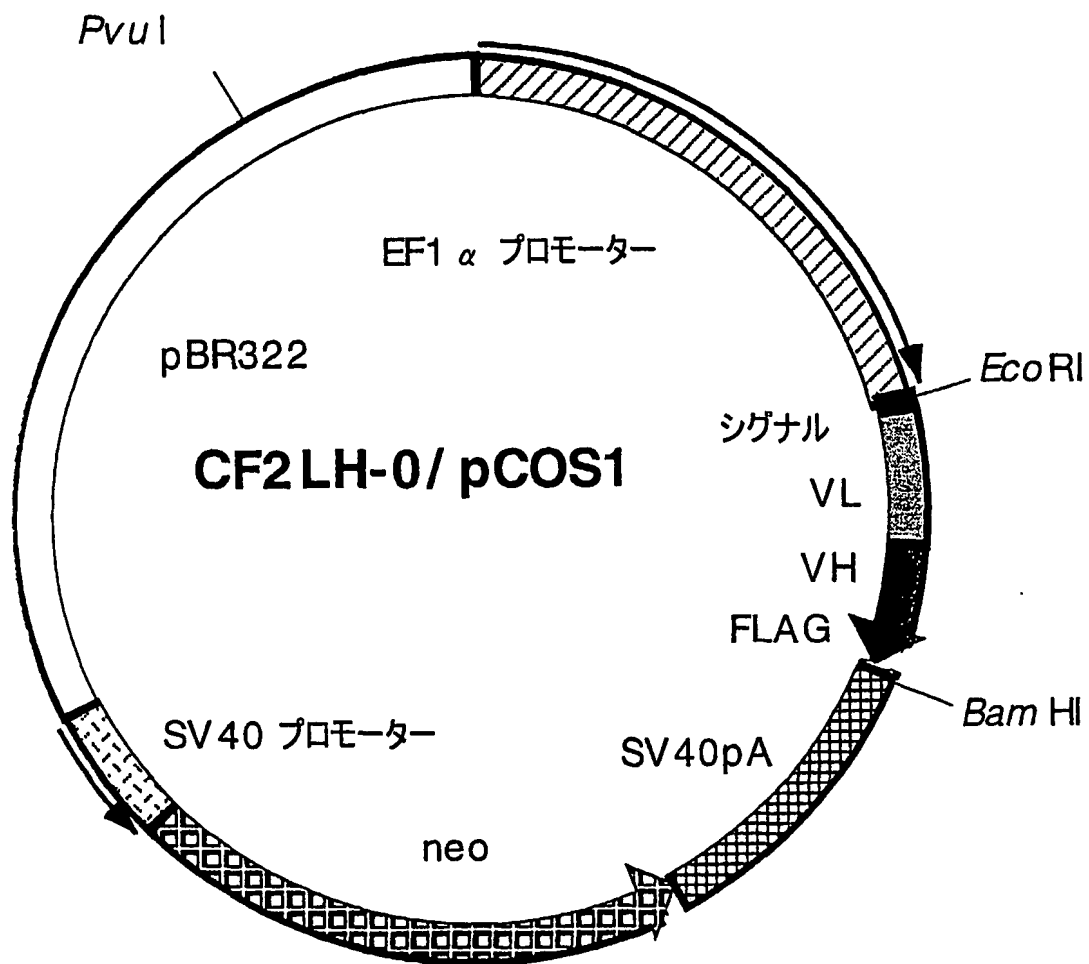
図 3 6

<HLタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

<div>H鎖</div>		リンカー		<div>L鎖</div>	FLAG
... gtc tcg agt				gac gtc gtg ...	
V S S				D V V	
プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー			
CF2HL-0/pCOS1	0	gtc tcg agt		gac gtc gtg	
		V S S		D V V	
CF2HL-3/pCOS1	3	gtc tcg agt ggt ggt tcc		gac gtc gtg	
		V S S G G S		D V V	
CF2HL-4/pCOS1	4	gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc		gac gtc gtg	
		V S S G G G S		D V V	
CF2HL-5/pCOS1	5	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc		gac gtc gtg	
		V S S G G G G S		D V V	
CF2HL-6/pCOS1	6	gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc		gac gtc gtg	
		V S S G G G G G S		D V V	
CF2HL-7/pCOS1	7	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc	gac gtc gtg		
		V S S G G G G G S	D V V		

28/43

図 37



29/43

図 3 8

<LHタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; text-align: center;">L鎖</div> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 100px;"></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; text-align: center;">H鎖</div> <div style="background-color: black; width: 20px; height: 15px; margin-left: 5px;"></div> </div>		リンカー		
... gag ata aaa			cag gtc caa ...	FLAG
E I K			Q V Q	

プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー	
CF2LH-0/pCOS1	0	gag ata aaa	cag gtc caa
		E I K	Q V Q
CF2LH-3/pCOS1	3	gag ata aaa tcc gga ggc	cag gtc caa
		E I K S G G	Q V Q
CF2LH-4/pCOS1	4	gag ata aaa tcc gga ggt ggc	cag gtc caa
		E I K S G G G	Q V Q
CF2LH-5/pCOS1	5	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc	cag gtc caa
		E I K S G G G G	Q V Q
CF2LH-6/pCOS1	6	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc	cag gtc caa
		E I K S G G G G G	Q V Q
CF2LH-7/pCOS1	7	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc	cag gtc caa
		E I K S G G G G G G	Q V Q

30/43

39

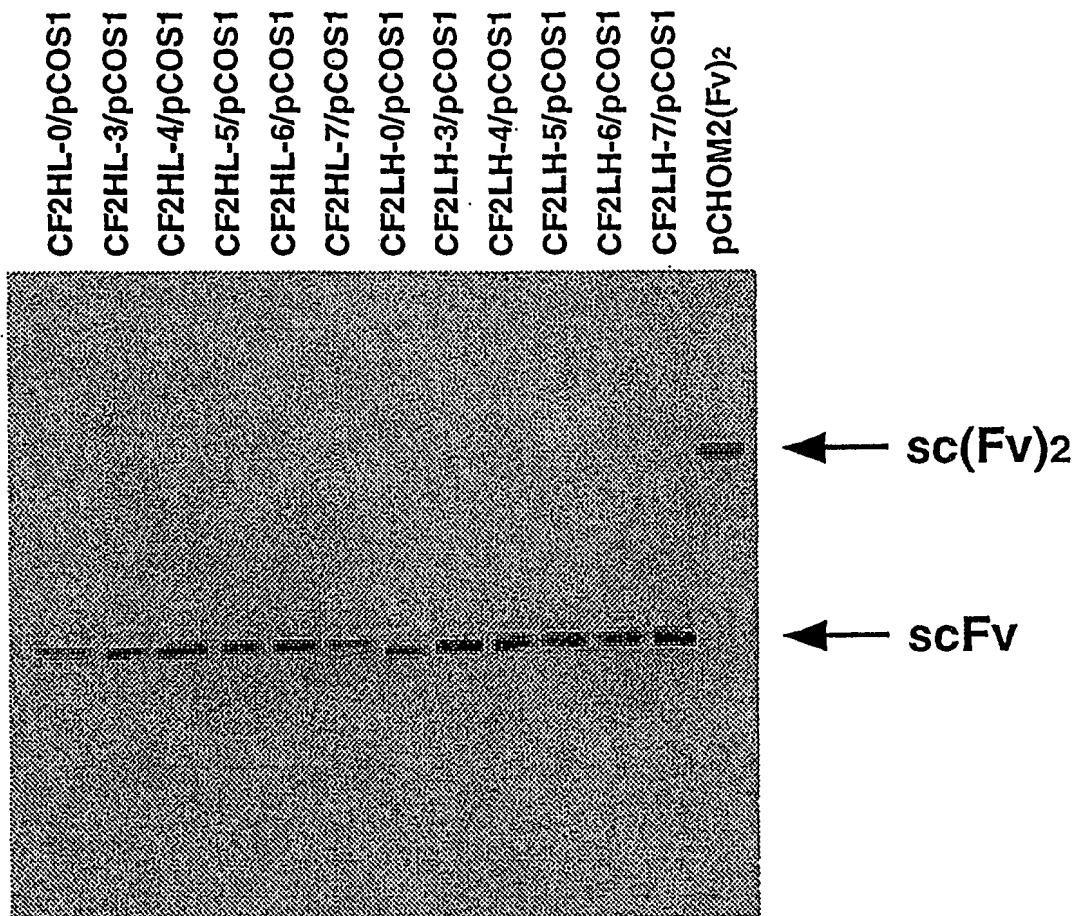
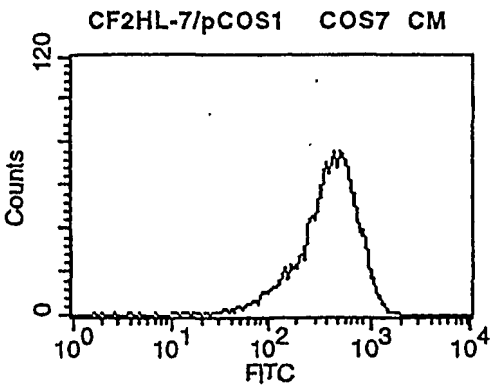
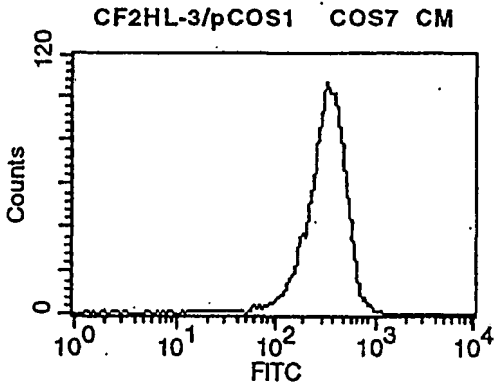
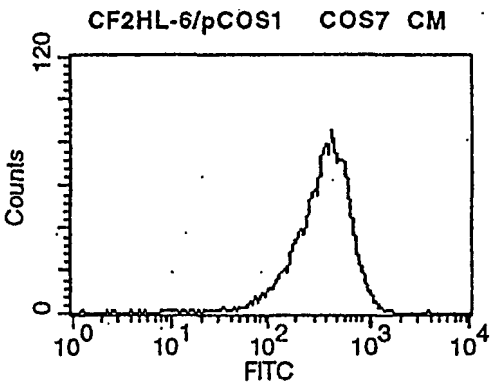
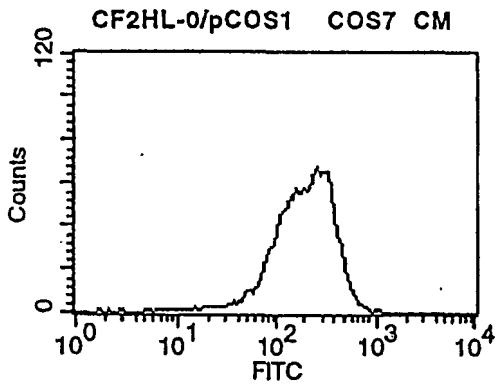
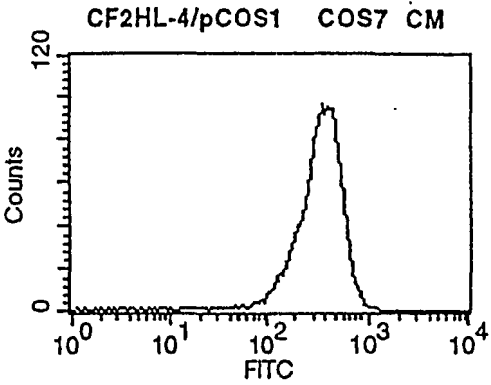
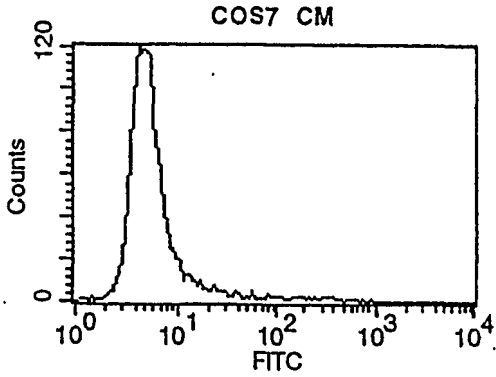
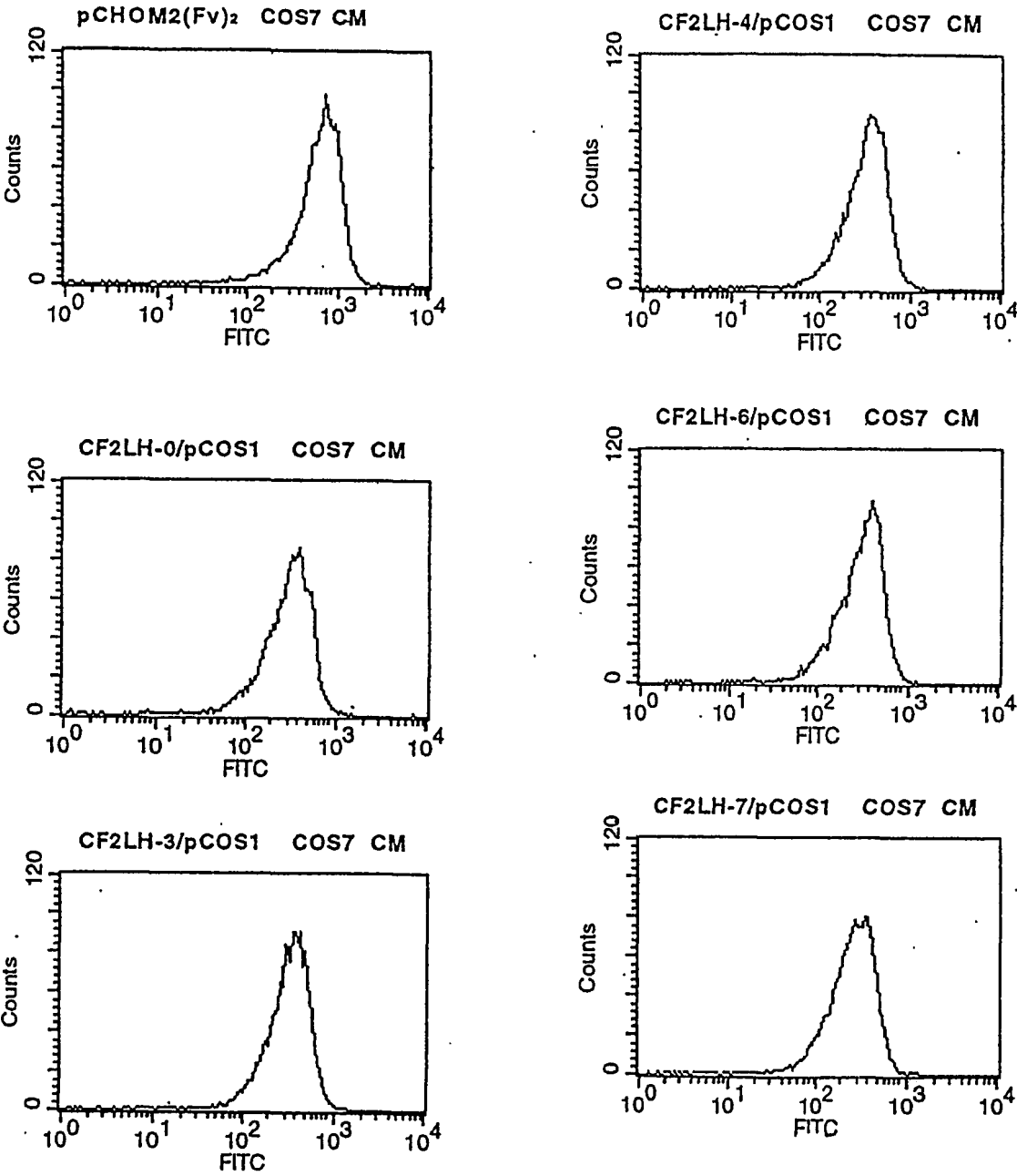


図 40 a



40 b



41

33/43

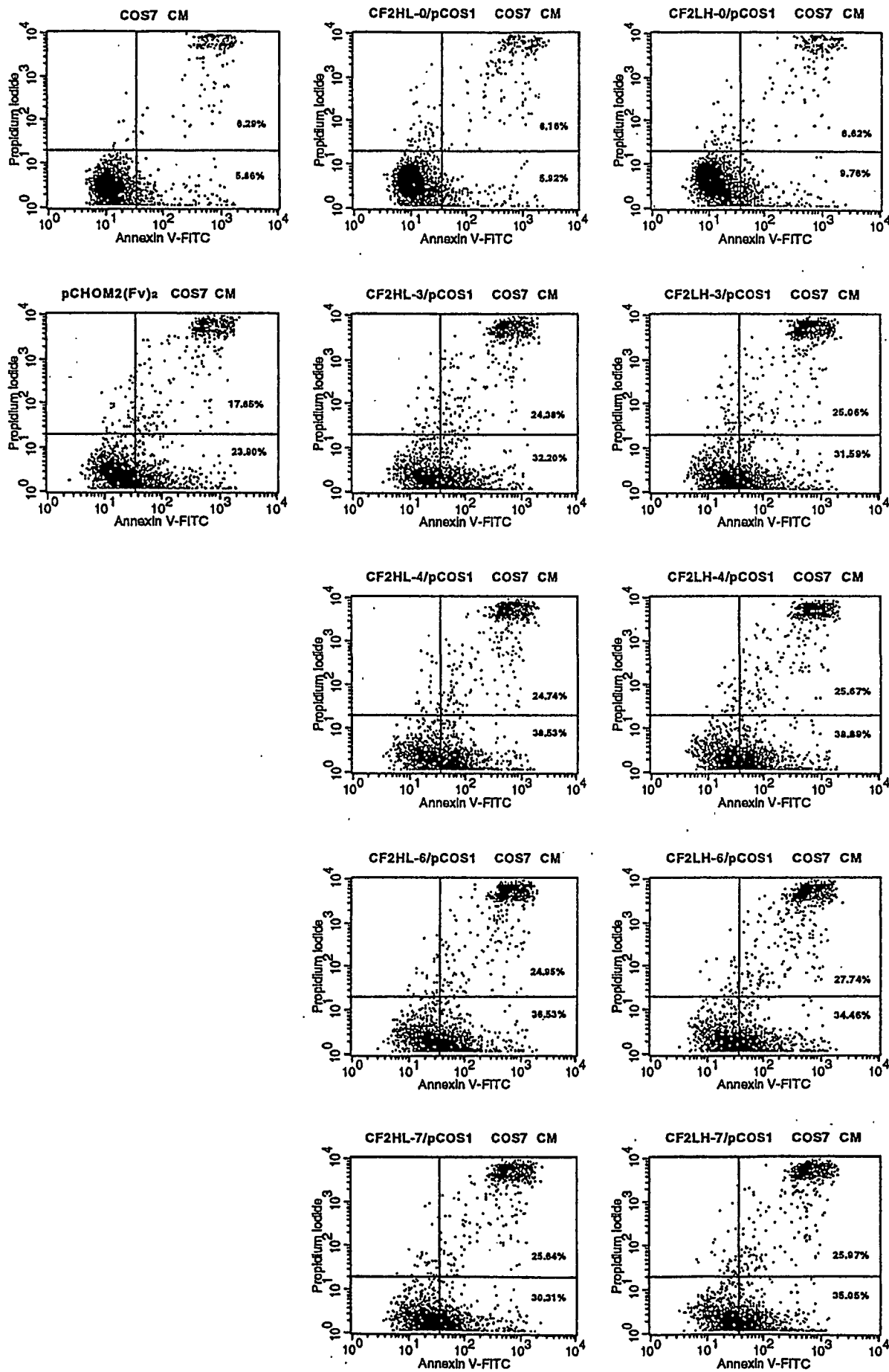


図 4 2

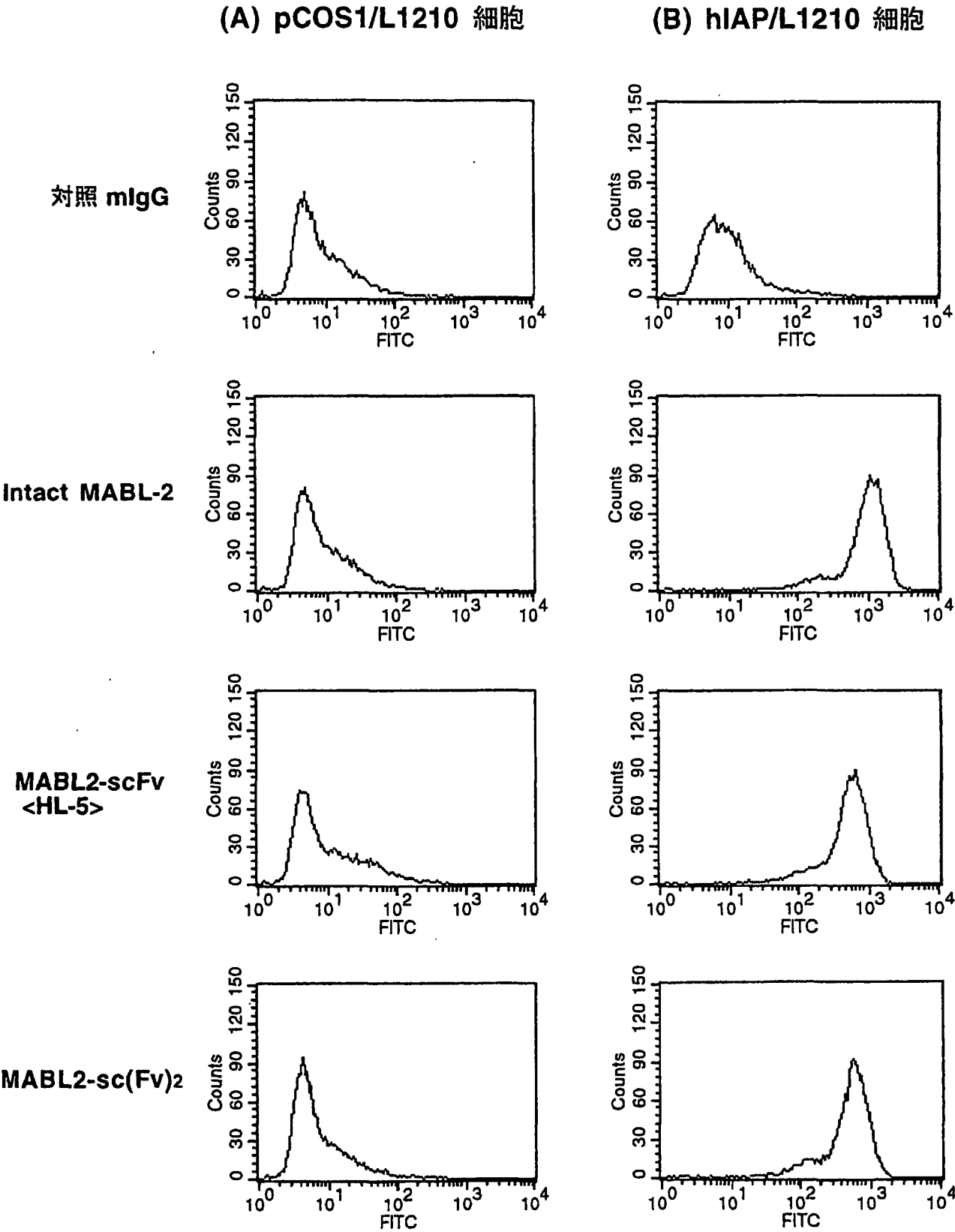
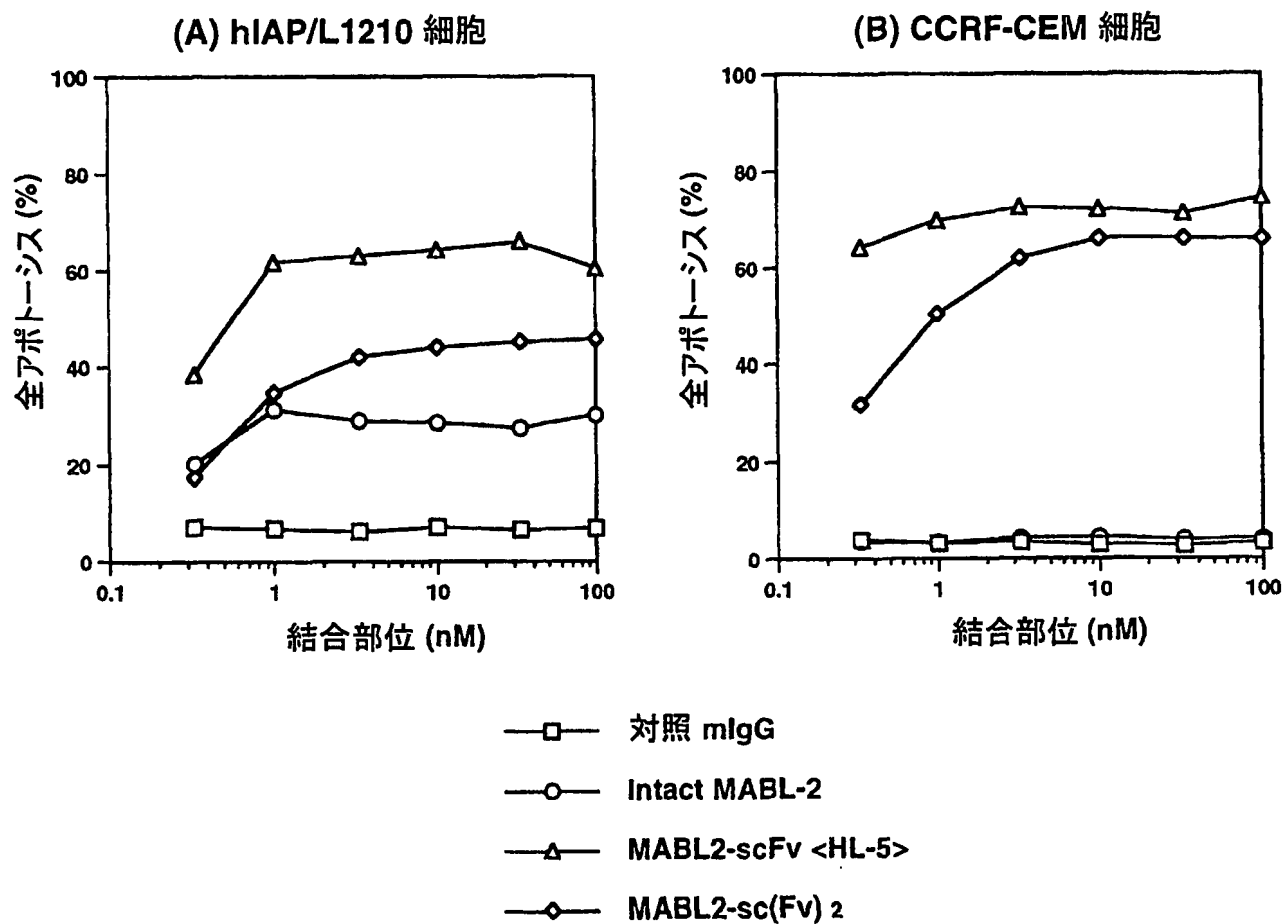
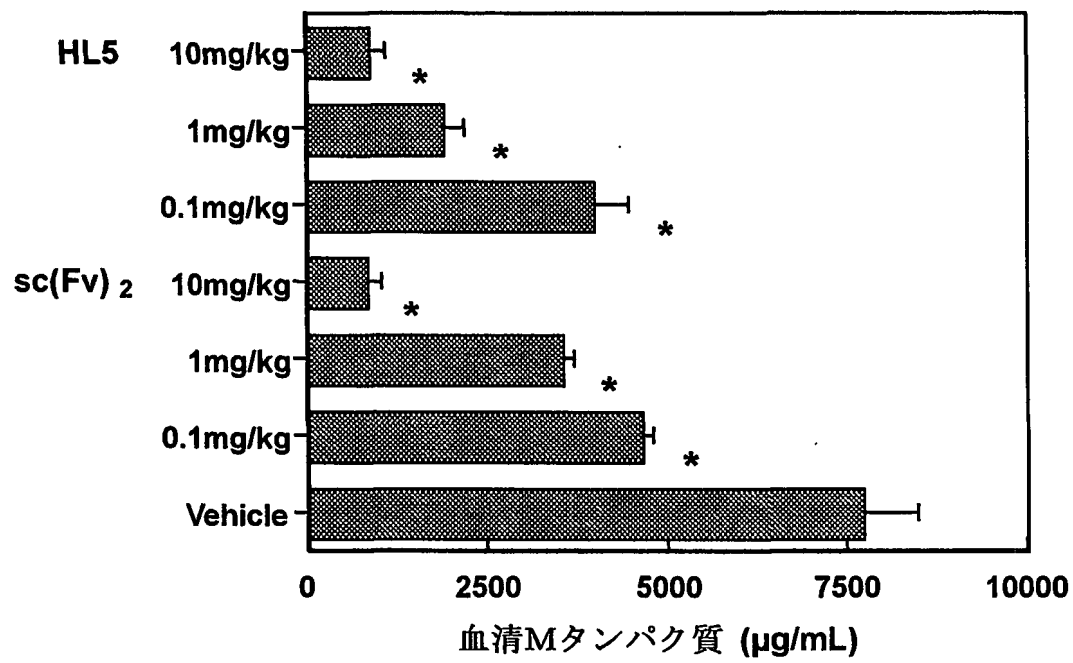


図 4 3



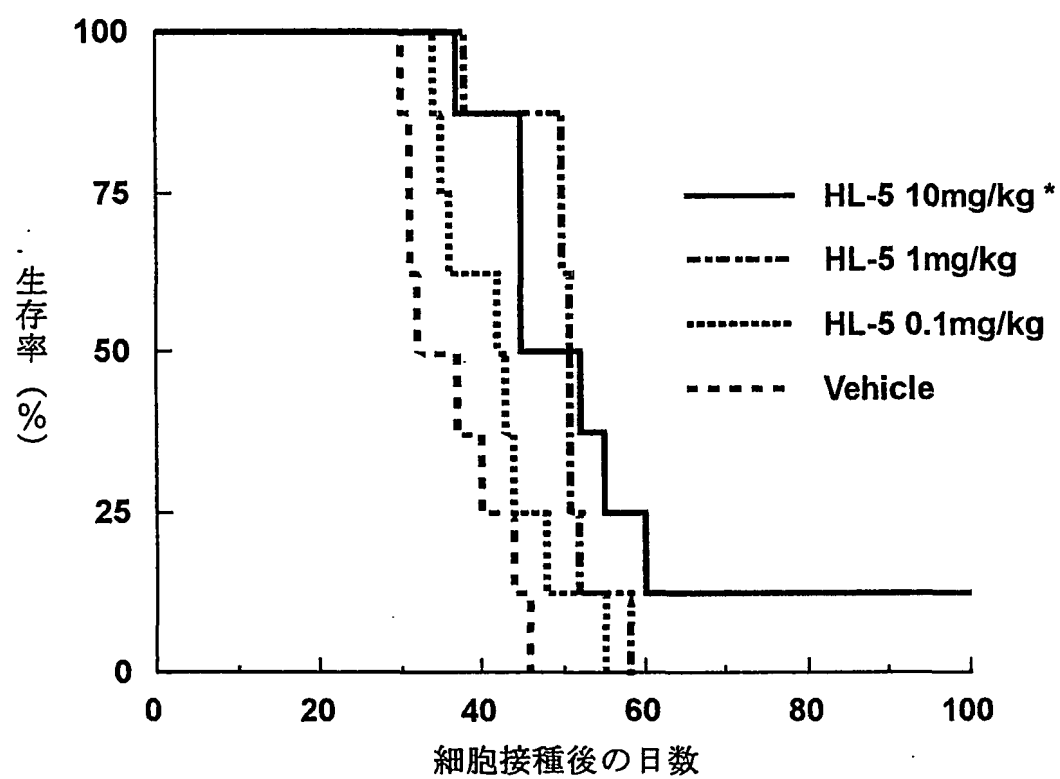
36/43

図 4 4



37/43

図 4 5



38/43

図 4 6

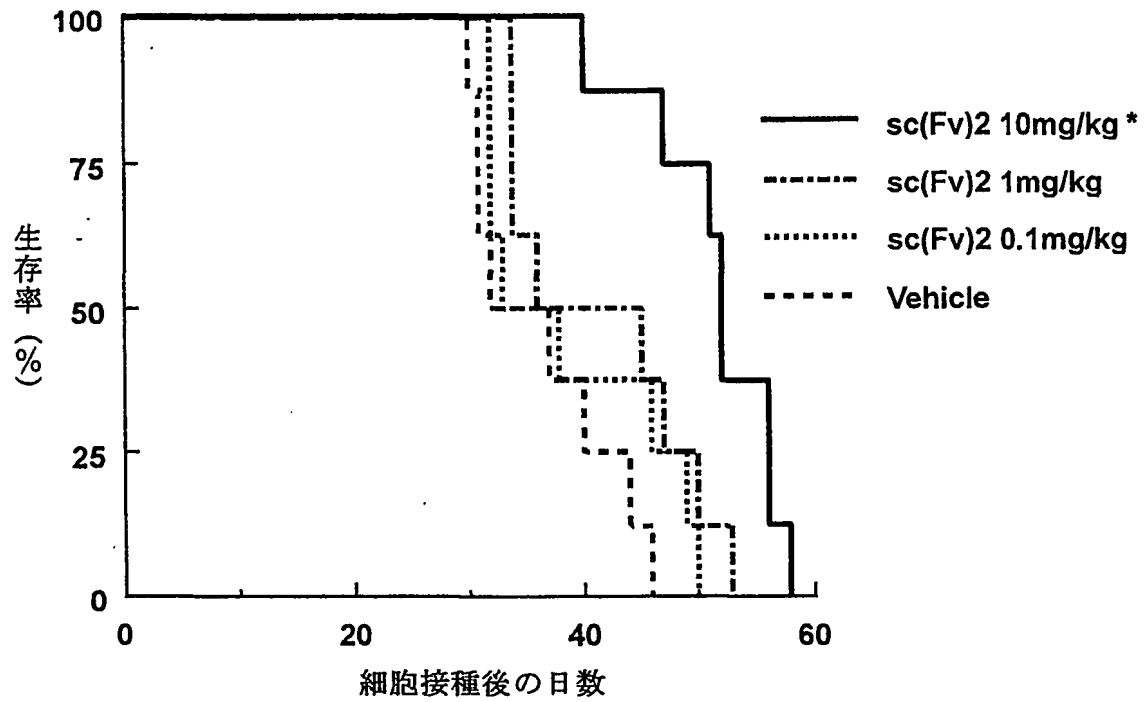
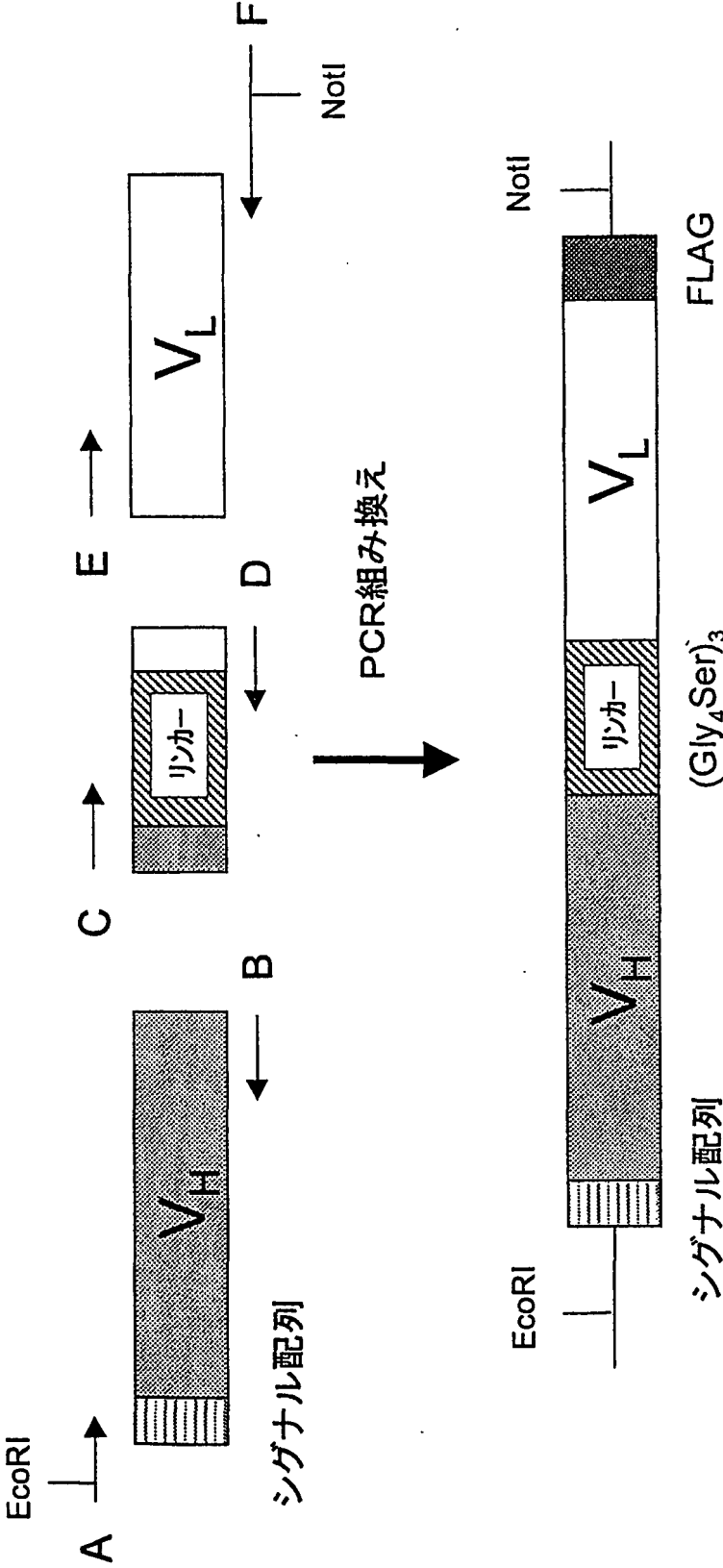


図 4 7



40/43

図 48

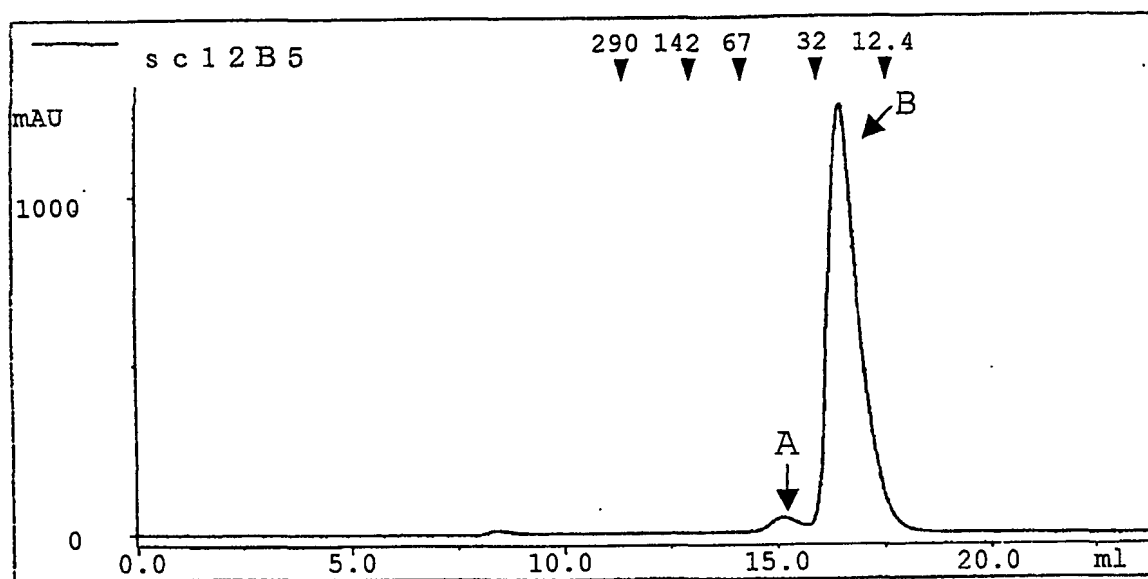


図 4 9

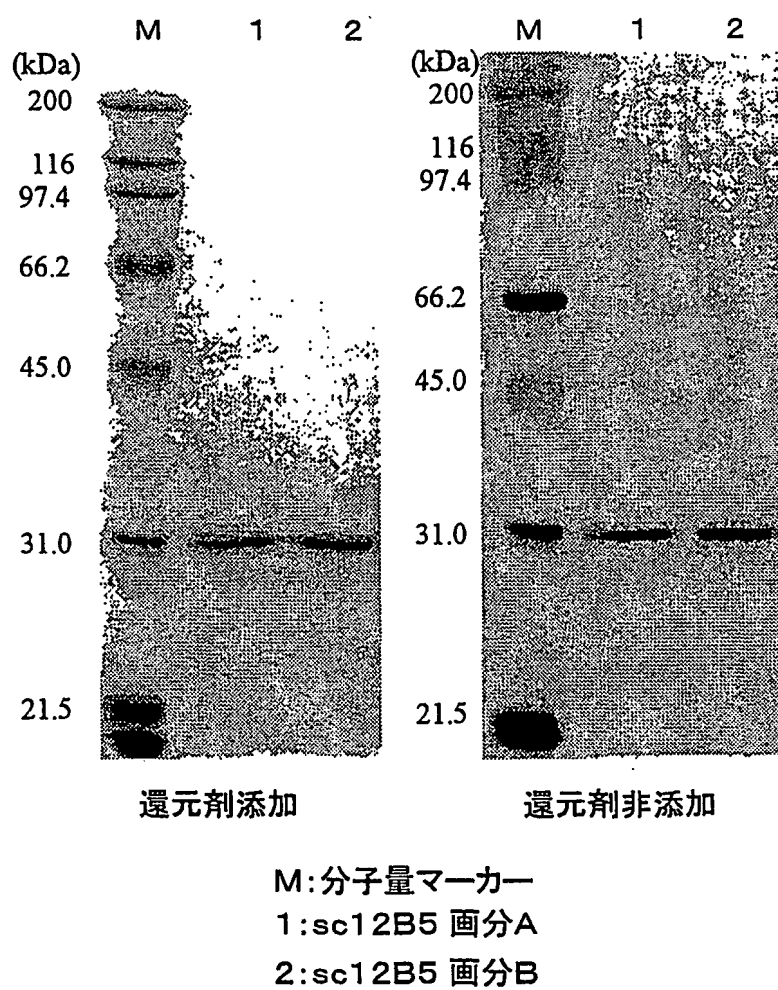
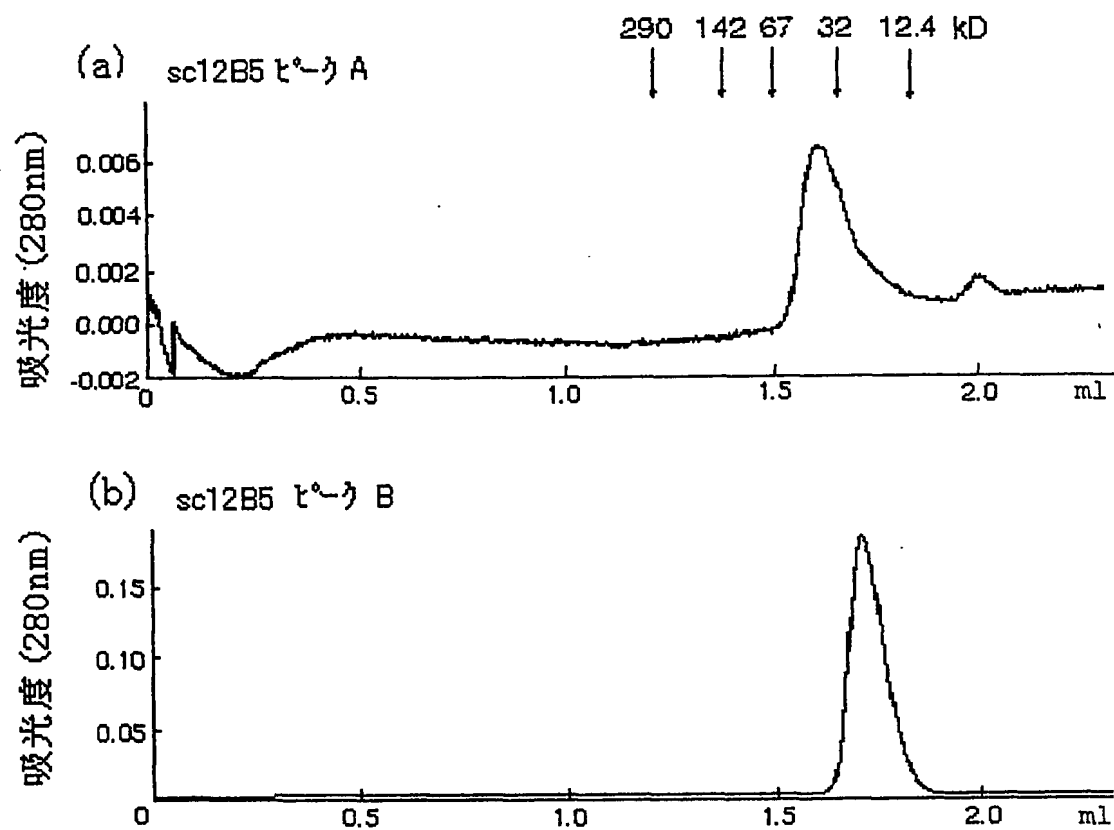


図 5 0



43/43

図 5 1

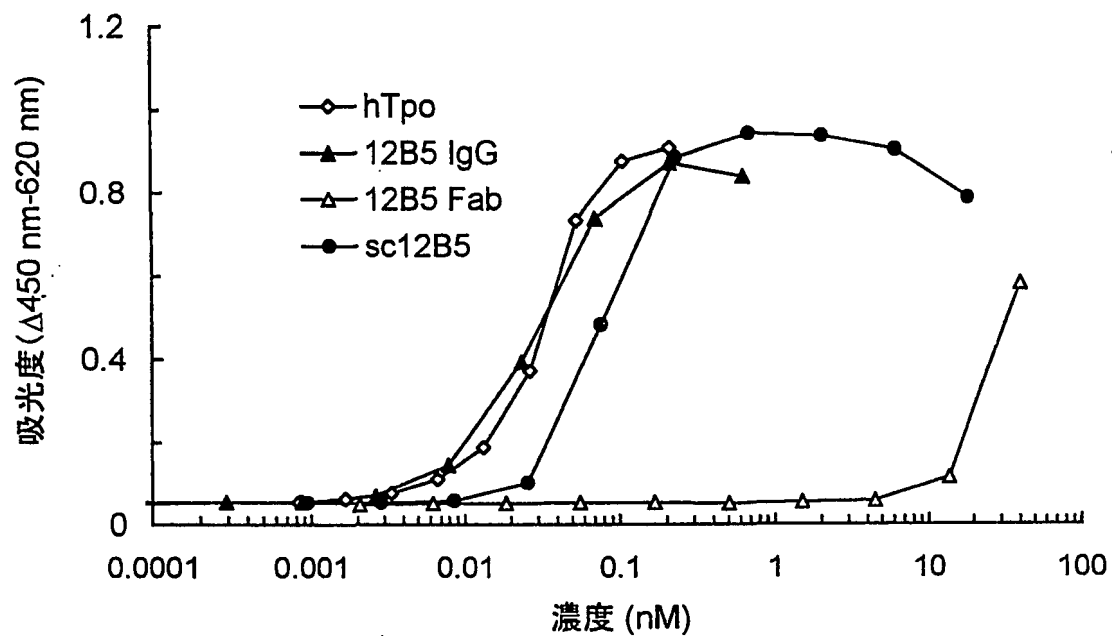
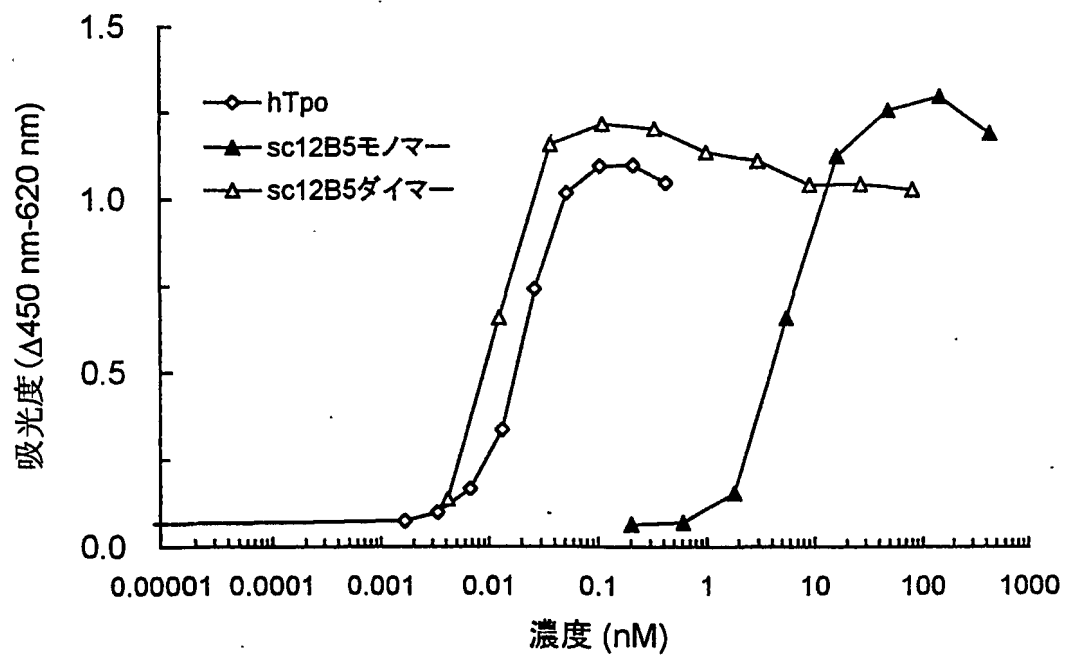


図 5 2



1/51

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonist antibody

<130> FP1009

<141> 2001-04-17

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321821

<151> 2000-10-20

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<150> PCT/JP01/01912

<151> 2001-03-12

<160> 109

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

ccatcctaatacgcactcactatagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

3/51

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5 10 15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20 25 30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35 40 45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

50 55 60

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65 70 75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80 85 90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95 100 105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

4/51

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110

115

120

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

5/51

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggg act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca g 409

Ser

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M2L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

6/51

5	10	15	
ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90			
Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu			
20	25	30	
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135			
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser			
35	40	45	
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180			
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
50	55	60	
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225			
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val			
65	70	75	
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270			
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
80	85	90	
tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315			
Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
95	100	105	
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360			
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr			
110	115	120	
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
125	130		

<210> 8

<211> 409

7/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5 10 15

ggg gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggg act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

8/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca g 409

Ser

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

9/51

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggtacca ctcacgtttt atttcagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cgcggtacca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

10/51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccoga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

11/51

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ggcggatcgg atgttgatgacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc ttgtagtct tttatttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

12/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (826)

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5 10 15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20 25 30

cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35 40 45

gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys

50 55 60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro

65 70 75

tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

80 85 90

aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315

Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu

95 100 105

13/51

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

110

115

120

ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405

Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

125

130

135

aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt 450

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

140

145

150

ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495

Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

155

160

165

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

170

175

180

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

185

190

195

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

200

205

210

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

215

220

225

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

230

235

240

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

14/51

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245

250

255

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5 10 15

ggc gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggc cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggc act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95 100 105

16/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

140

145

150

tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495

Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser

155

160

165

ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

170

175

180

cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585

Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys

185

190

195

cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

200

205

210

TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

215

220

225

gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly

230

235

240

gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765

17/51

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly

245

250

255

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260

265

270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

18/51

50	55	60
cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct	225	
Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro		
65	70	75
tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc	270	
Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala		
80	85	90
act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc	315	
Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu		
95	100	105
agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga	360	
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
110	115	120
ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc	405	
Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
125	130	135
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt	450	
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
140	145	150
ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg	495	
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu		
155	160	165
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt	540	
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser		
170	175	180
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac	585	
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr		
185	190	195

19/51

ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

200 205 210

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

215 220 225

tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 720

Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

230 235 240

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245 250 255

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260 265 270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

<400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

20/51

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 5 10 15
 ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
 Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 50 55 60
 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

21/51

140	145	150
tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495		
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser		
155	160	165
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540		
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu		
170	175	180
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585		
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys		
185	190	195
cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630		
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg		
200	205	210
ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675		
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr		
215	220	225
gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720		
Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly		
230	235	240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765		
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly		
245	250	255
ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810		
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp		
260	265	270
aaa taa tga 819		
Lys		

22/51

<210> 26

<211> 456

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (450)

<223> pCHO-shIAP. Soluble human IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc 45

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys

5

10

15

gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90

Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe

20

25

30

acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135

Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn

35

40

45

atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180

Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe

50

55

60

aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225

Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser

65

70

75

act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270

Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln

80

85

90

tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315

23/51

Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala

95 100 105

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360

Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr

110 115 120

aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405

Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser

125 130 135

tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450

Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

140 145 150

tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

24/51

<400> 28

ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5 10 15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20 25 30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35 40 45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50 55 60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65 70 75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270

25/51

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu

80 85 90

gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr

95 100 105

gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360

Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly

110 115 120

ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt 405

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val

125 130 135

gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp

140 145 150

caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495

Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

155 160 165

aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

170 175 180

tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

185 190 195

gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr

200 205 210

ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675

Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe

26/51

215	220	225
tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720		
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr		
230	235	240
aag ctg gaa ata aaa taa tga 741		
Lys Leu Glu Ile Lys		

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

cgcgctcgacc gatccgccac caccgaacc accaccacc gaaccaccac caccttttat 60

ttccagcttg gt

72

<210> 32

<211> 1605

27/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

<223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

<400> 32

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5 10 15

ggg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggg act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

28/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
 Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765

29/51

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly
 245 250 255
 ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg 855
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu
 275 280 285
 cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag 900
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 290 295 300
 atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att 945
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile
 305 310 315
 cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 990
 His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 320 325 330
 tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc 1035
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 335 340 345
 aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 1080
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
 350 355 360
 tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat 1125
 Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 365 370 375
 tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 1170
 Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln

30/51

380	385	390
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215		
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
395	400	405
ggg ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260		
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser		
410	415	420
cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305		
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser		
425	430	435
tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350		
Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr		
440	445	450
tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395		
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu		
455	460	465
atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440		
Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
470	475	480
agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485		
Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg		
485	490	495
gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530		
Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr		
500	505	510
cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575		
His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
515	520	525

31/51

gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tgaggaattc ccacatggg atg 23

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

32/51

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

33/51

gcaattggac ctgttttata tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32

34/51

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

cagtctcgag tgggtggtcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cagtctcgag tgggtggtggt tccgacgtcg tgatgaccca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

cagtctcgag tgggtggtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

35/51

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

36/51

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv<HL-0>

<400> 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5

10

15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20

25

30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35

40

45

50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70

75

80

85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90

95

100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

37/51

105	110	115	
tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408			
Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
120	125	130	135
gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459			
Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp			
140	145	150	
caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510			
Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly			
155	160	165	170
aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561			
Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu			
175	180	185	
ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612			
Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
190	195	200	
ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663			
Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala			
205	210	215	220
gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714			
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr			
225	230	235	
ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765			
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp			
240	245	250	255
aaa taa tga gga tcc 780			
Lys			

38/51

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggc ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

39/51

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggcggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

40/51

5	10	15	
agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102			
Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu			
20	25	30	
gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153			
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
35	40	45	50
aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204			
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro			
55	60	65	
aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255			
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg			
70	75	80	85
ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306			
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val			
90	95	100	
gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357			
Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro			
105	110	115	
tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408			
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln			
120	125	130	135
cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459			
Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys			
140	145	150	
aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510			
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln			
155	160	165	170

41/51

aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

175

180

185

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp

190

195

200

aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663

Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp

205

210

215

220

tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp

225

230

235

ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

240

245

250

255

aaa taa tga gga tcc 780

Lys

<210> 55

<211> 351

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (351)

<223> 12B5HV. 1-351 peptide

<400> 55

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc 60

42/51

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu
 5 10 15 20
 tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct 120
 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp Val Arg Gln Ala
 25 30 35 40
 cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat 180
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr
 45 50 55 60
 gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat 240
 Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca 300
 Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala
 85 90 95 100
 cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt 351
 His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser Ser
 105 110 115

<210> 56

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<400> 56

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt gtc cag tgt 57

43/51

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly Val Gln Cys

5

10

15

<210> 57

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-1

<400> 57

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccc gggggtcctt gagtc 115

<210> 58

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-2

<400> 58

aaggatatac ctgccacca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcag 60

ccgtaggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcaggga ccccc 115

<210> 59

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

44/51

<223> 12B5VH-3

<400> 59

ggcaggtata tcctttgacg gaagaagtga atactatgca gactccgtgc agggccgatt 60
caccatctcc agagacagtt ccaagaacac cctgtatctg caaatgaaca gcctg 115

<210> 60

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-4

<400> 60

actcgagacg gtgaccattg tcccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60
cgcacagtaa tacacagccg tgtcctcggc tctcaggctg ttcatttg 108

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-S, PCR primer

<400> 61

ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45/51

<220>

<223> 12B5VH-A, PCR primer

<400> 62

ttgggatcca ctcaccactc gagacggtga ccat 34

<210> 63

<211> 433

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (419)

<223> HEF-12B5H-g gamma. 12-419 peptide

<400> 63

aagcttcac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga 56

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg

1

5

10

15

ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 116

Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

20

25

30

35

tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg 176

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp

40

45

50

55

gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga 236

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg

60

65

70

75

agt gaa tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag 296

Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys

46/51

80	85	90	95
aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 356			
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
100	105	110	115
gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg 416			
Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser			
120	125	130	135
agt ggtgagtgga tcc 433			
Ser			

<210> 64

<211> 323

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (323)

<223> 12B5LV. 1-323 peptide

<400> 64

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc 60			
Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr			
5	10	15	20
atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag cca 120			
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
25	30	35	40
ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca 180			
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser			
45	50	55	60

47/51

agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga 300

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly

85

90

95

100

ggg acc aag ctg gag atc aaa 323

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

105

<210> 65

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<400> 65

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca ggt gcc 60

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala

5

10

15

20

Aaa tgt 66

Lys Cys

<210> 66

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-1

<400> 66

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
aaatgtgaca tccagatgac ccagtcctct tccaccctgt ctgcatctat 110

<210> 67

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-2

<400> 67

ggagtttagg ggctttccct ggcttctgct gataccaggc caaccagtga taaataccct 60
cgctggcccg gcaggatgatg gtgactctgt ctccaataga tgcagacagg 110

<210> 68

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-3

<400> 68

aagcccctaa actcctgata tataaggcct ctagtttagc cagtggggcc ccatcaaggt 60
tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 110

<210> 69

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-4

<400> 69

accatcagca gcctgcagcc tgatgatatt gcaacttatt actgccaaca atatagtaat 60
tatccgctca ctttcggcgg agggaccaag ctggagatca aa 102

<210> 70

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-S, PCR primer

<400> 70

ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32

<210> 71

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-A, PCR primer

<400> 71

tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35

<210> 72

50/51

<211> 415

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (398)

<223> HEF-12B5H-g kappa. 12-398 peptide

<400> 72

aagcttccac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc 56

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

tgg ctc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca 116

Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala

20

25

30

35

tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg 176

Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu

40

45

50

55

gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt 236

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser

60

65

70

75

tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc 296

Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

80

85

90

95

acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat 356

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn

100

105

110

115

tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cgtgagtggg tcctaga 415

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

120

125

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12P21/08, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00,
A61K39/395, A61P35/00, 29/00, 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12P21/08, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00,
A61K39/395, A61P35/00, 29/00, 7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 00/53634, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 September, 2000 (14.09.00), Claims; Figs. 4-6; example 5 (Family: none)	1-8, 11-19
X Y	WO, 99/12973, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18 March, 1999 (18.03.99), Figs. 23, 24, 27-29; examples 4,5 & AU, 9890028, A1 & JP, 11-155569, A & EP, 1035132, A1	1,2,6-8,11-17 3-5,8-10,18,19
X Y	Mateo, V et al., "CD 47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia", Nature Medicine (November 1999), Vol. 5, No. 11, pp.1277-84 abstract; page 1279, left column, line 6 to right column, line 3; Fig. 3	1,2,6-8,11-17 3-5,9-10,18,19
Y	Pettersen, R.D. et al., " CD47 signals T cell death", J. Immunol. (15 June 1999), Vol. 162, No. 12, pp. 7031-40 abstract, page 7032, right column, Par. No. 2 to page 7033, left column, Par. No. 1	1-8,11-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 June, 2001 (04.06.01)

Date of mailing of the international search report
12 June, 2001 (12.06.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03288

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, 4946778, A (Genex Corp.), 07 August, 1990 (07.08.90), Full text & US, 5260203, A & US, 5455030, A & US, 5869620, A & US, 5518889, A & US, 5534621, A	1-8,11-19
X Y	Rozsnyay, Z. et al., " Phenylarsine oxide (PAO) blocks antigen receptor-induced calcium response and tyrosine phosphorylation of a distinct group of proteins", Immunology Lett. (August 1993), Vol. 37, Nos. 2-3, pp 197-205, abstract	1,2,6-8,11-17 3-5,18,19
X Y	Bazzoni, F et al., "Chimeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (06 June, 1995), Vol. 92, No. 12, pp. 5376-80, abstract	1,2,6-17 3-5,18,19
X Y	Gell, M. et al., "TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis", Lymphokine and Cytokine Research (June 1993), Vol. 12, No. 3, pp.143-8	1,2,6-17 3-5,18,19
X Y	O'Brien, Richard M. et al., "Monoclonal antibodies for the human insulin receptor stimulate intrinsic receptor-kinase activity", Biochem. Soc. Trans. (1986), Vol. 14, No.6, pp. 1021-3, Full text	1,2,6-17 3-5,18,19
X Y	Yarden, Y. and Schlessinger, J., "Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation", Biochemistry (1987), Vol. 26, No. 5, pp. 1434-42, abstract	1,2,6-17 3-5,18,19
A	Yanabu, M. et al., "Tyrosine phosphorylation and p72syk activation by an anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody", Blood (1997), Vol. 89, No.5, pp.1590-1598, abstract	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03288

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 20 to 22 substantially involve methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: a parts of Claims 1-19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

Neither the description nor the flexible disc submitted discloses the base sequences and amino acid sequences of SEQ ID NOS:73 to 84 concerning the production of the reconstituted 12B5 single-stranded Fv stated in the description.

Thus, the inventions relating to the reconstituted 12B5 single-stranded Fv and a process for producing the same fail to satisfy the requirements to such an extent as enabling the performance of any meaningful international search. Thus no international search report is made under the provisions of Article 17(2)(a)(ii) of the PCT.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12P21/08, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, A61K39/395, A61P35/00, 29/00, 7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12P21/08, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, A61K39/395, A61P35/00, 29/00, 7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/53634, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14.9月.2000 (14.09.00), 請求の範囲, 図4-6, 実施例5参照, ファミリーなし	1-8, 11-19
X	WO, 99/12973, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18.3月.1999 (18.03.99), 図23, 24, 27-29, 実施例4, 5参照	1, 2, 6-8, 11-17
-		—
Y	& AU, 9890028, A1 & JP, 11-155569, A & EP, 1035132, A1	3-5, 9-10, 18, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.06.01

国際調査報告の発送日

12.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	Mateo, V. et al., 'CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia' Nature Medicine (1999 Nov), Vol. 5, No. 11, pp. 1277-84 要約, 第1279頁左欄第6行—右欄第3行, 図3参照	1, 2, 6-8, 11-17 — 3-5, 9-10, 18, 19
Y	Pettersen, R. D. et al., 'CD47 signals T cell death' J. Immunol. (1999 Jun 15) Vol. 162, No. 12, pp. 7031-40 要約, 第7032頁右欄第2段落—第7033頁左欄第1段落参照	1-8, 11-19
Y	US, 4946778, A (Genex Corp.), 7.8月.1990 (07.08.90), 全文参照 & US, 5260203, A & US, 5455030, A & US, 5869620, A & US, 5518889, A & US, 5534621, A	1-8, 11-19
X — Y	Rozsnyay, Z. et al., 'Phenylarsine oxide (PAO) blocks antigen receptor-induced calcium response and tyrosine phosphorylation of a distinct group of proteins' Immunology Lett. (1993 Aug), Vol. 37, No. 2-3, pp. 197-205, 要約参照	1, 2, 6-8, 11-17 — 3-5, 9-10, 18, 19
X — Y	Bazzoni, F. et al., 'Chimeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity' Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995 Jun 6), Vol. 92, No. 12, pp. 5376-80, 要約参照	1, 2, 6-17 — 3-5, 18, 19
X — Y	Grell, M. et al., 'TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF) -receptors can independently mediate cytolysis' Lymphokine and Cytokine Research (1993 Jun), Vol. 12, No. 3, pp. 143-8, 要約参照	1, 2, 6-17 — 3-5, 18, 19
X — Y	O'Brien, Richard M. et al., 'Monoclonal antibodies for the human insulin receptor stimulate intrinsic receptor-kinase activity' Biochem. Soc. Trans. (1986), Vol. 14, No. 6, pp. 1021-3, 全文参照	1, 2, 6-17 — 3-5, 18, 19
X — Y	Yarden, Y. and Schlessinger, J., 'Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation' Biochemistry (1987), Vol. 26, No. 5, pp. 1434-42, 要約参照	1, 2, 6-17 — 3-5, 18, 19
A	Yanabu, M. et al., 'Tyrosine phosphorylation and p72syk activation by an anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody' Blood (1997), Vol. 89, No. 5, pp. 1590-1598, 要約参照	1-19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲20-22は、治療による人体の処置方法に関するものを実質的に包含しており、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1-19の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

別紙参照

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 2. について

明細書中の再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v の製造に関連する、配列番号：7 3 - 8 4 の塩基配列及びアミノ酸配列が明細書に記載されておらず、提出されたフレキシブルディスクにも記録されていない。

よって、再構成 1 2 B 5 一本鎖 F v 及びその製造に関連する発明は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしておらず、PCT 17 条 (2) (a) (i) の規定により国際調査報告を作成しない。